



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Odontología**

**Escuela Profesional de Odontología**

**Actividad inhibitoria de la Stevia rebaudiana y Xilitol  
sobre flora mixta salival**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista**

**AUTOR**

**Maisely Fabiluz GALINDO GOMEZ**

**ASESOR**

**Elba Estefania MARTÍNEZ CADILLO**

**Lima, Perú**

**2018**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Galindo M. Actividad inhibitoria de la Stevia rebaudiana y Xilitol sobre flora mixta salival [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Escuela Profesional de Odontología; 2018.

---



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE ODONTOLOGIA**

**VICE DECANATO ACADÉMICO**

**UNIDAD DE ASESORÍA Y ORIENTACIÓN DEL ESTUDIANTE**



# ACTA

Los Docentes que suscriben, reunidos el veinte de noviembre del 2018, por encargo de la Sra. Decana de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para obtener el Título Profesional de Cirujano Dentista de la Bachiller:

**GALINDO GOMEZ, Maisely Fabiluz**

## CERTIFICAN :

Que, luego de la Sustentación de la Tesis « **ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA STEVIA REBAUDIANA Y XILITOL SOBRE FLORA MIXTA SALIVAL** » y habiendo absuelto las preguntas formuladas, demuestra un grado de aprovechamiento:..... sobresaliente....., siendo calificado con un promedio de:..... dieciocho..... 18.....

(en letras)

(en números)

En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los veinte días del mes de noviembre del dos mil dieciocho.

**PRESIDENTE DEL JURADO**

**Mg. Sofia Belinda Espinoza Escajadillo**

**MIEMBRO**

**C.D. Vilma Georgina Chuquihuaccha Granda**

**MIEMBRO (ASESOR)**

**Blg<sup>a</sup>. Elba Estefanía Martínez Cadillo**

Escala de calificación: Grado de Aprovechamiento:  
Sobresaliente (18-20), Bueno (15-17), Regular (12-14), Desaprobado (11 ó menos)  
Criterios : Originalidad, Exposición, Dominio del Tema, Respuestas.

## **JURADO DE SUSTENTACIÓN**

- **Presidente:** Mg. Sofía Espinoza Escajadillo
- **Miembro:** C.D. Vilma Georgina Chuquihuaccha Granda
- **Miembro Asesor:** Blg<sup>a</sup>. Elba Estefania Martínez Cadillo

## **DEDICATORIA**

Mi tesis se la dedico primero a Dios, ya que gracias a él he logrado concluir mi carrera.

A mi madre por el infinito amor y apoyo que me ha brindado en todos estos años y por sus consejos que me ayudaron a ser una mejor persona. A toda mi familia, por haber estado siempre a mi lado, brindándome toda su ayuda y soportando largas noches de estudio a mi lado, siempre con palabras de aliento.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Blg<sup>a</sup>. Elba Martínez Cadillo, mi asesora, por su valiosa guía y apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

A mi presidente de jurado, Mg. Blg<sup>a</sup>. Sofía Espinoza Escajadillo y miembro de jurado C.D. Vilma Chuquiuaicha, por su tiempo y transmisión de conocimientos, acompañados de sabios consejos.

Al Dr. Américo Castro Luna, por su tiempo, consejos y apoyo durante la elaboración del extracto de *Stevia rebaudiana*.

Al personal del laboratorio de microbiología, por su apoyo durante la ejecución del proyecto.

A la universidad y mis maestros, por todos estos años en los que ayudaron al desarrollo de mi formación profesional.

## RESUMEN

**Objetivo:** El propósito del presente estudio fue determinar y evaluar la actividad inhibitoria del extracto etanólico al 1,07mg/ml de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70° y la solución acuosa a 1mg/ml de xilitol sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro*. **Materiales y métodos:** Para el desarrollo de la prueba se incubaron en aerobiosis a 37°C por 24 horas 0,2 ml de saliva recolectada por estimulación en 0,8 ml de cada solución preparada (*Stevia rebaudiana*, Xilitol, etanol de 70°, clorhexidina al 0,12% y Caldo BHI infusión cerebro corazón). Posteriormente, se realizó la siembra sobre superficie por diseminación con espátula de Digrafsky en placa de Petri con Agar Tripticosa soya TSA de 0,1 ml de inóculo en dilución seriada 1:10 hasta alcanzar el factor de dilución  $10^{-2}$  y se procedió a la incubación en aerobiosis a 37°C por 24 horas para luego realizar el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml). El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico Stata versión libre 12.0., se calcularon medidas de tendencia central y dispersión, se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro – Wilk para conocer la normalidad de los datos, y el Test de Kruskal – Wallis y post hoc “Test de Dunn” para la prueba de hipótesis. Se trabajó con un nivel de significancia del 5% ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** El extracto etanólico al 1,07mg/ml de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, la Clorhexidina al 0,12% y el etanol de 70° presentan 0 unidades formadoras de colonias. Y la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol presento un índice de crecimiento bacteriano de  $816 \times 10^{-4} \pm 657,91$  UFC/ml, con una diferencia altamente significativa con respecto al extracto etanólico al 1,07mg/ml de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, clorhexidina al 0,12% y etanol de 70°, siendo el segundo con mayor crecimiento bacteriano después del caldo BHI infusión cerebro corazón. **Conclusiones:** Se determinó que el extracto etanólico al 1,07mg/ml de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70° posee actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, mientras que la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol disminuye el crecimiento bacteriano, pero no de manera significativa.

**Palabras clave:** *Stevia rebaudiana*, Xilitol, actividad inhibitoria.



## SUMMARY

**Objective:** The purpose of the study was to determine and evaluate the inhibitory activity of the ethanolic extract at 1.07mg/ml of *Stevia rebaudiana* and ethanol 70° and the solution at 1mg/ml of Xylitol on the growth of the microorganisms present in the mixed salivary flora, *in vitro*.

**Materials and methods:** For the development of the test, 0.2ml of saliva collected by stimulation in 0.8ml of each prepared solution (*Stevia rebaudiana*, Xylitol, ethanol 70°, chlorhexidine 0.12% and broth BHI infusion brain heart) were incubated in aerobiosis at 37°C for 24 hours. Subsequently, the seeding was performed on a Surface by dissemination with a Digrafsky spatula in a Petri dish with Agar Trypticase soybean TSA of 0.1 ml of inoculum in a 1:10 serial dilution until the dilution factor  $10^{-2}$  was reached and incubation was carried out. aerobiosis at 37°C for 24 hours to then count the colony forming units (UFC/ml). The statistical analysis was performed with the statistical program Stata free version 12.0, measures of central tendency and dispersion were calculated, the Shapiro - Wilk normality test was applied to know the normality of the data, and the Kruskal - Wallis test and of post hoc “Test de Dunn” for hypothesis testing. We worked with a level of significance of 5% ( $p < 0.05$ ). Results: The ethanolic extract at 1.07mg/ml *Stevia rebaudiana* and ethanol 70°, Chlorhexidine 0.12% and ethanol 70° present 0 colony forming units. And the aqueous solution at 1mg/ml of Xylitol showed a bacterial growth index of  $816 \times 10^{-4} \pm 657.91$  CFU / ml, with a highly significant difference with respect to the ethanolic extract at 1.07mg/ml of *Stevia rebaudiana* and ethanol 70°, chlorhexidine 0.12% and ethanol 70°, the second with the highest bacterial growth after broth BHI infusion brain heart. Conclusions: It was determined that the ethanolic extract at 1.07mg/ml of *Stevia rebaudiana* and ethanol 70° possesses inhibitory activity on the growth of the microorganisms present in mixed salivary flora, while the aqueous solution at 1mg/ml of Xylitol decreases the growth bacterial, but not significantly.

**Keywords:** *Stevia rebaudiana*, Xylitol, inhibitory activity.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	12
II.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	14
	2.1. Área problema.....	14
	2.2. Delimitación del problema .....	15
	2.3. Formulación del problema .....	16
	2.4. Objetivos de la investigación.....	16
	2.4.1. Objetivo general.....	16
	2.4.2. Objetivos específicos.....	16
	2.5. Justificación de la investigación.....	17
	2.6. Limitaciones.....	18
	2.7. Viabilidad.....	18
III.	MARCO TEÓRICO .....	19
	3.1. Antecedentes.....	19
	3.2. Bases teóricas .....	30
	3.3. Hipótesis.....	53
	3.3.1. Hipótesis general .....	53
	3.3.2. Hipótesis específicas .....	53
	3.4. Operacionalización de variables.....	53
IV.	METODOLOGÍA .....	56
	4.1. Tipo de investigación .....	56

4.2. Población y muestra .....	56
4.3. Procedimientos y técnicas.....	59
4.4. Recolección de datos .....	64
4.5. Procesamiento y análisis de datos .....	65
V. RESULTADOS .....	66
VI. DISCUSIÓN .....	72
VII. CONCLUSIONES.....	76
VIII. RECOMENDACIONES .....	77
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	78
X. ANEXOS .....	89

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 2.....</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 3.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabla 4.....</b>	<b>67</b>
<b>Tabla 5.....</b>	<b>69</b>
<b>Tabla 6.....</b>	<b>70</b>
<b>Tabla 7.....</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICO

<b>Grafico 1 .....</b>	<b>68</b>
------------------------	-----------

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 2.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 3.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 4.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 5.....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 6.....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 7.....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 8.....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 9.....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 10.....</b>	<b>98</b>
<b>Figura 11.....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 12.....</b>	<b>100</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.....</b>	<b>89</b>
<b>Anexo 2.....</b>	<b>90</b>
<b>Anexo 3.....</b>	<b>91</b>
<b>Anexo 4.....</b>	<b>92</b>
<b>Anexo 5.....</b>	<b>93</b>
<b>Anexo 6.....</b>	<b>95</b>

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la caries dental es una de las enfermedades más comunes del país y a pesar de las campañas de prevención y promoción de la salud no se ha podido disminuir la prevalencia ni la incidencia de la misma que registra nuevos casos cada año.

Como en la mayoría de enfermedades que suscitan en el Perú, son las poblaciones vulnerables las más propensas a tener mayor riesgo de sufrir caries dental ya sea por el nivel socioeconómico, la dieta o los hábitos de higiene personal, u otros factores que intervienen de manera directa dentro de esta. La caries dental se presenta desde la infancia, etapa de nuestras vidas donde la dieta se basa en su mayoría en carbohidratos y azúcares refinados, siendo esta la principal causa junto a los malos hábitos de higiene oral los principales causantes de la desmineralización de la superficie dental por los ácidos liberados por el metabolismo de las bacterias.

En este contexto, se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que ayuden a la prevención de la caries dental, estas deben ser asequibles económicamente y atractivas para la población a la cual se quiere proteger. Es así que, en los últimos años, la fitoterapia ha tomado mayor vigencia en el área de la medicina, pues posee a través de recursos naturales, propiedades para curar enfermedades, aliviar el dolor, etc.

Tanto la *Stevia rebaudiana* proveniente del arbusto del mismo nombre y el Xilitol, extraído del abedul son dos edulcorantes naturales usados en la actualidad por pacientes con enfermedades sistémicas como Diabetes Mellitus, trigliceridemia, hipertensión, etc., donde el control del sobrepeso por la cantidad de carbohidratos y azúcares que se consume es importante. Se hace necesario estudiar las propiedades de estas en cuanto a cómo pueden ayudar a prevenir la enfermedad de caries dental tanto en pacientes comprometidos sistémicamente y los que no lo estén, opten por la medicina natural, obteniendo así alternativas de bajo costo, que sean accesibles a la clase popular.

El objetivo será determinar la actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* y la solución acuosa de xilitol.

La investigación se realizó por el interés de dar a conocer cuál de estos edulcorantes, uno más conocido en nuestro país y de fácil obtención, la *Stevia rebaudiana*, y el otro más usado en el extranjero, sobre todo en países asiáticos, el Xilitol, presenta una mayor acción inhibitoria sobre los microorganismos que se encuentran en la flora mixta salival. Además de crear alternativas para antimicrobianos conocidos como la clorhexidina, que es de alto costo y uso limitado.

Para ello se cultivará la saliva obtenida por estimulación de personas con caries dental junto al extracto etanólico al 1,07 mg/ml de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, la solución acuosa a 1 mg/ml de Xilitol, dos controles positivos (Clorhexidina al 0,12% y etanol a 70°) y el caldo BHI infusión cerebro corazón como control negativo, en placas de Petri con Agar TSA tripticasa soya por 24 horas en condiciones de aerobiosis a 37°C. Para el posterior conteo del número de unidades formadoras de colonias (UFC) lo cual ayudó a evaluar su actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en la flora mixta salival.



## II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 2.1. Área problema

La caries dental es la enfermedad más común de la cavidad oral <sup>(1)</sup>. Estudios indican que los altos índices de esta enfermedad se encuentran en países en vías de desarrollo y en zonas donde existe gran pobreza, mientras que en países europeos con alta disponibilidad de recursos en cuanto a investigación ocurre lo contrario <sup>(2)</sup>.

El tipo de dieta se encuentra asociada con la presencia de caries dental, siendo así que, en los infantes donde el consumo de hidratos de carbono y azúcares refinados, como la sacarosa, asociados a inadecuados hábitos básicos de higiene oral ayudan a que los microorganismos presentes en la boca se adhieran a la superficie del diente a través de la película adquirida que al fermentar los azúcares originan ácidos como producto final de su metabolismo, disminuyendo el pH de la cavidad oral y produciéndose así como consecuencia: la desmineralización del esmalte dental <sup>(3-5)</sup>.

La *Stevia rebaudiana*, es una planta introducida hace más de década y media, y de cultivo adaptable a los diversos tipos de clima presentes en el Perú. Posee en sus hojas al *esteviósido*, usada por sus propiedades como edulcorante natural. Se han realizado investigaciones *in vitro* que determinan la actividad inhibitoria y antibacteriana de la *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans*. Así mismo, el Xilitol es un fitoquímico ampliamente estudiado en países asiáticos, no metabolizado por las bacterias adheridas a la biopelícula dental y por lo tanto su presencia en la cavidad oral no genera la posibilidad de desarrollar caries dental <sup>(2,6-10)</sup>.

Se deduce entonces que al reemplazar el consumo de sacarosa por *Stevia rebaudiana* o Xilitol estaremos reduciendo la incidencia de caries dental.

## 2.2. Delimitación del problema:

En el Perú y en países donde existen zonas con índices elevados de pobreza, la caries dental y la enfermedad periodontal parecen ser enfermedades de la cavidad oral que no se pueden prevenir, y es entonces cuando se buscan nuevas alternativas <sup>(2)</sup>.

La *Stevia rebaudiana* contiene glicósidos presentes en las hojas como: el *esteviósido* y *rebaudiósido*, de los cuales se sabe no tienen actividad cariogénica por lo que pueden ser usados como recursos de prevención y reducción de la prevalencia e incidencia de caries dental sobre grupos etáreos vulnerables, como los niños. Estudios *in vitro* han demostrado que los extractos etanólicos y metanólicos a base de *Stevia rebaudiana* en diferentes concentraciones presentan actividad inhibitoria sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophillus*, los cuales están íntimamente relacionados con la presencia de caries dental debido a la disminución en la producción de polímeros insolubles bacterianos. Además, presentan propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes, por lo que podrían resultar potencialmente efectivas en el tratamiento de enfermedades periodontales <sup>(11,12)</sup>.

En cuanto al Xilitol como edulcorante natural con cinco carbonos dentro de su estructura química no puede ser degradada por los microorganismos presentes en la cavidad oral disminuyendo así la presencia de dientes con lesiones por caries dental, que en estudios ha demostrado poseer propiedades para ayudar a la remineralización del esmalte dental en tiempos prolongados de consumo <sup>(10,13)</sup>.

Se requiere, conocer la actividad inhibitoria, *in vitro*, que tendrán los edulcorantes naturales como lo son la *Stevia rebaudiana* y el Xilitol sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en la cavidad oral.

### 2.3. Formulación del Problema:

¿Presentarán actividad inhibitoria el extracto etanólico al 1,07mg/ml de *Stevia Rebaudiana* en etanol a 70° y la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro*?

### 2.4. Objetivos de la investigación:

#### 2.4.1. Objetivo General:

- Determinar y evaluar la actividad inhibitoria del extracto etanólico al 1,07 mg/ml de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70° y la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro*.

#### 2.4.2. Objetivos Específicos:

- Determinar y analizar la actividad inhibitoria del extracto etanólico al 1,07 mg/ml en etanol a 70° de *Stevia rebaudiana* sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro* a las 24 horas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).
- Determinar y analizar la actividad inhibitoria de la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro* a las 24 horas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).
- Comparar la actividad inhibitoria del extracto etanólico al 1,07 mg/ml en de *Stevia rebaudiana* etanol a 70° y de la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol sobre los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro* a las 24 horas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

## 2.5. Justificación de la investigación:

La *Stevia rebaudiana* ha demostrado tener cualidades para la prevención de la caries dental que al ser usado por su actividad inhibidora del crecimiento bacteriano resulta ser eficaz, esto se consigue debido a que el *Streptococcus mutans* no puede utilizarla durante su metabolismo para la obtención de energía celular.

Se espera por ello que con el consumo prolongado de *Stevia rebaudiana* se disminuya la cantidad de bacterias y su capacidad para producir caries dental, como consecuencia de la menor producción de polímeros insolubles bacterianos que generan ácidos que atacan al esmalte dental <sup>(2,6,11)</sup>.

El Xilitol está presente en diversas frutas y vegetales e incluso es producido en el organismo humano durante el metabolismo, estableciendo un ciclo estéril de consumo de energía intracelular que rompe la cadena energética del fosfato e inhibe, *in vitro*, la producción de polisacáridos de los microorganismos de la cavidad oral. Controlando la acumulación de la biopelícula en las superficies dentales, evitando la inflamación gingival y lesiones por caries dental. Análisis químicos han demostrado que la biopelícula que se forma en presencia de Xilitol contiene más calcio que en presencia de sacarosa, ya que este calcio está parcialmente presente en forma soluble y puede estar disponible para la remineralización de sitios deficientes de calcio <sup>(5,13,14)</sup>.

Actualmente se ha investigado mucho sobre fitoterapia en odontología, y se hace necesario que en un país como el nuestro dónde existe diversidad de plantas medicinales y un alto índice y prevalencia de caries dental, se investigue de manera continua sobre nuevas alternativas en cuanto a prevención y tratamiento de la misma.

En cuanto a los resultados, estos nos permitirán implementar un protocolo de prevención y reducción de la incidencia de la caries dental con el uso de edulcorantes naturales (*Stevia rebaudiana* y Xilitol).

Y así crear nuevas alternativas de consumo de azúcares para niños y adultos que no resulten desagradables al paladar y sean económicamente accesibles para todo estrato socioeconómico.

#### 2.6. Limitaciones:

- Existen pocas investigaciones que ayuden a desarrollar esta investigación.
- El alto costo de los insumos.
- La falta de equipo sofisticado y en óptimas condiciones para el desarrollo de pruebas de perfil bioquímico, cromatografía de gases y espectrometría de gases.
- Generar las condiciones óptimas para la ejecución de la investigación.
- Al tratarse de un estudio *in vitro*, las condiciones de desarrollo de microorganismos son simuladas en comparación con otros factores que pueden influir en las condiciones *in vivo*.

#### 2.7. Viabilidad:

La investigación es viable, desde el punto de vista económico, teórico y social puesto que, a pesar de las limitaciones que se tienen, se cuentan con todas las bases teóricas que anteceden a la investigación, con los recursos para llevarlo a cabo y no se causará ningún daño o perjuicio.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Antecedentes del problema

**Viteri et al. (2010)** observaron el efecto de los extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni a diferentes concentraciones y solventes (agua, metanol, etanol, acetato de etilo y hexano) sobre el crecimiento *in vitro* del *S. mutans* y del *L. acidophilus*, determinando el posible potencial anticariogénico de este edulcorante natural. Utilizaron la técnica de maceración al frío para conseguir los extractos y se reprodujeron mediante repiques cada 24 horas en caldo *Trypticase de soya* (STS) a las cepas de *S. mutans* y *L. acidophilus*, para mantenerlas vivas. El ensayo microbiológico se realizó con la técnica de agar difusión con bacterias y perforación de placa de forma duplicada para cada uno de los extractos, usando como controles positivos a la clorhexidina 0,2%, vancomicina, penicilina; y como controles negativos a 20 uL de cada solvente. Finalmente se hicieron observaciones a las 24, 48 y 72 horas para determinar el efecto de estos extractos en el crecimiento de las bacterias. Los resultados demostraron que: el extracto con agua, metanol y etanol requirieron una concentración de 400mg/ml para producir efecto inhibitorio, generándose un halo de 9; 11,5 y 12,17 mm respectivamente en promedio para ambas especies bacterianas, mientras que el extracto con acetato de etilo requirió una concentración de 200 mg/ml y formó un halo de inhibición de 11,5 mm en promedio para el *S. mutans* y 10,5 mm en promedio para el *L. acidophilus*; , en cuanto al extracto hexanólico se usó una mínima concentración de 50 mg/ml con el que se obtuvo un promedio de halo de inhibición de 14,5 mm en promedio para el *S. mutans* y 15,5 mm en promedio para el *L. acidophilus*. Los controles positivos: vancomicina de 30 ug/ 1ml y la clorhexidina de 0,2% generaron halos de 16,5 y 15 mm en promedio para el *S. mutans* y 17 y 15 para el *L. acidophilus* en promedio, respectivamente, y la penicilina generó un halo de inhibición de 21 mm en promedio solo para el *L. acidophilus*. Los solventes usados como controles negativos no mostraron actividad inhibitoria en contra de las cepas estudiadas. En conclusión: Los extractos de *Stevia*

*Rebaudiana* con metanol y etanol son estadísticamente iguales al ser comparados con la vancomicina, sin embargo, el extracto hexanólico mostró mejores resultados en la inhibición del crecimiento para *S. mutans* y *L. acidophilus* a las 48 horas, por lo que se podría deducir un posible poder anticariogénico de este endulzante natural <sup>(6)</sup>.

**Giertsen et al. (2011)** probaron que las exposiciones repetidas de Xilitol a biopelículas orales mixtas *in vitro* de 6 especies (*Actinomyces naeslundii*, *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus oralis*, *Veillonella dispar* y *Streptococcus mutans* (8 cepas)) reducen el número de bacterias a través de ciclos metabólicos. Para ello se adoptó una modificación del modelo de Zürich *in vitro* de placa supragingival, colocándose 15 discos de hidroxiapatita estériles por biofilm de 6 especies mixtas y se cubrieron con 1 600 microlitros de saliva procesada hasta la formación de la biopelícula oral para la posterior exposición de estas a soluciones de Xilitol al 7.5% en discos con el objetivo de medir la concentración final del poliol para poder realizar el sembrado, en condiciones de anaerobiosis y evaluar las unidades formadoras de colonias totales (UFC). Utilizaron como controles a la saliva y al sorbitol. Los resultados demostraron que en las biopelículas tratadas con sorbitol después de los ciclos metabólicos se encontraron mayores recuentos de colonias de *S. sobrinus* ( $9,7 \pm 0,5$  UFCs) y de *S. mutans* ( $14,0 \pm 3,2$  UFCs), mientras que luego de la exposición al Xilitol los recuentos de colonias de *S. sobrinus* ( $7,8 \pm 0,6$  UFCs) y de *S. mutans* ( $9,8 \pm 1,9$  UFCs) disminuyeron. En conclusión, el Xilitol no inhibió el crecimiento de las cepas de *Streptococcus* a pesar de la exposición repetida y concentraciones relativamente altas de Xilitol, más si hubo disminución en comparación al sorbitol <sup>(15)</sup>.

**Gamboa et al. (2012)** evaluaron la actividad antibacteriana de extractos de *Stevia rebaudiana* con 5 solventes (hexano, metano, etanol, acetato de etilo y cloroformo) sobre 16 cepas bacterianas (*S. mtutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *L. acidophilus*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis* y *S. sobrinus*). Se elaboraron los extractos usando la técnica de maceración en frío y se prepararon concentraciones de 15 mg/ml, 30 mg/ml, 60 mg/ml y 120

mg/ml para cada extracto. La actividad antimicrobiana de los extractos se probó usando el método de difusión en pozo, usando como control positivo a la vancomicina 180 ug/ml y la azitromicina 150 ug/ml; y cada solvente como control negativo, los cuáles se incubaron a 37°C durante 24 a 72 horas bajo condiciones anaeróbicas. Cada ensayo se realizó por triplicado y el resultado promedio se informó en mm. Los resultados demostraron que ninguno de los 5 controles negativos tenía actividad antimicrobiana, mientras que la vancomicina y la azitromicina obtuvieron valores que varían de 18 a 25 mm. El extracto de hexano en promedio mostró la más baja actividad antimicrobiana, mientras que ocurrió lo contrario con el etanol 120 mg/ ml, acetato de etilo 60 mg/ml y cloroformo 60 mg/ml cuya mayor acción se observó sobre *L. acidophilus*, *L. platarum*, *L. casei* y *L. brevis* a las 72 horas<sup>(7)</sup>.

**Mohammadi-Sichani *et al.* (2012)** evaluaron la actividad antibacteriana de las hojas de *S. rebaudiana* usando 4 solventes (metanol, etanol, acetona y agua) en concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,13 mg/ml. El ensayo antimicrobiano se realizó usando el método de difusión en agar-pozo, tomándose como control positivo a la tetraciclina y como control negativo al dimetilsulfóxido al 0,25%, para finalmente incubar las placas por triplicado en medio aeróbico a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. La actividad antimicrobiana (Concentración mínima inhibitoria y Concentración bactericida mínima) de cada extracto se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición que se consideró activo si era de 8 mm o más. Los resultados demostraron que: los extractos de metanol (21,3 ± 2,2 mm), etanol (27,0 ± 0,8 mm), y acetona (28,7 ± 2,8 mm) fueron muy efectivos contra *S. mutans* pero el extracto acuoso no mostró actividad inhibitoria; la concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima del etanol fueron 6,25 mg/ml y 12.5 mg/ml, de la acetona 3,13 mg/ml y 12,5 mg/ml y del metanol 50 mg/ml y 100 mg/ml. En conclusión, los extractos de acetona y etanol de hojas de *S. rebaudiana* mostraron mayor actividad antimicrobiana contra *S. mutans*<sup>(16)</sup>.



**Marttinen et al. (2012)** compararon los efectos del Xilitol (sensible y resistente) sobre *S. mutans* NCTC 10449 y CI 2366. Para ello se elaboró una biopelícula *in vitro* de tres especies (*A. naeslundii*, *S. sanguinis* y la cepa de *S. mutans*) a partir de saliva pasteurizada de 5 sujetos sanos, para luego ser sembradas repetidamente dos veces al día en infusión BHI (Cerebro-corazón) en discos de hidroxiapatita. Las cepas resistentes al Xilitol (Xr) se elaboraron para probar la pérdida de la inhibición del crecimiento por Xilitol. Los discos se expusieron a medios que contenían 250 microlitros de saliva y de la solución con o sin Xilitol al 5% e incubados por 8 horas. Los resultados demostraron que la presencia del Xilitol produjo una caída de aproximadamente 1-log UFCs en los niveles de la cepa de *S. mutans* sensible (Xs) NCTC 10449 y CI2366, pero los niveles de bacterias totales presentes en la biopelícula no fueron afectados significativamente y los niveles de las cepas Xr de *S. mutans* no se modificaron. En conclusión, se pudo demostrar en el estudio, una disminución selectiva en el recuento de cepas sensibles al Xilitol al 5% de *S. mutans* <sup>(17)</sup>.

**Ghezelbash et al. (2012)** mostraron los efectos del Xilitol y el eritritol al 2% y 4% sobre el crecimiento de *Streptococcus* orales. Se usaron para ello tres especies bacterianas: *S. mutans*, *S. sobrinus* y un aislado clínico de *S. sanguinis* que se cultivaron inicialmente en 5 ml de caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI) con el fin de producir bacterias en fase logarítmica. El ensayo microbiano de estos edulcorantes se realizó mediante el método de difusión en Agar, que se incubaron durante 48 horas a 37°C. Los controles incluyeron agua destilada y tetraciclina. Los efectos inhibidores se determinaron por la medida del diámetro de la zona de inhibición del crecimiento. Los resultados demostraron que tanto el xilitol como el eritritol inhibieron el crecimiento de todos los *Streptococcus* estudiados, con la solución al 4% dieron como resultado 68% y 71% para *S. mutans*, 72% y 76% para *S. sobrinus* y 65% y 77% para *S. sanguinis*, respectivamente. En conclusión, el eritritol es más eficaz que el xilitol sobre la inhibición del crecimiento de cepas de *Streptococcus* <sup>(18)</sup>.

**Padilla et al. (2013)** determinaron el efecto del Xilitol sobre la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. mutans* en saliva. El estudio fue de tipo experimental doble ciego, cuyo tamaño de muestra fue de 16 niñas de 7 a 9 años en el que se utilizó la técnica de observación para describir y registrar sistemáticamente los niveles de *S. mutans* antes y después de las 1, 3 y 5 semanas de aplicación de la pasta dental con Xilitol al 36% y el convencional con sólo flúor, las cuales debían ser usados 2 veces por día durante 2 minutos por 5 días, bajo supervisión. Los resultados demostraron que durante la etapa pre experimental el 58% de niños del grupo experimental y el 75% del grupo control presentaron entre 100 000 y 1 000 000 de UFC, es decir presentaban riesgo moderado; a la quinta semana el grupo experimental solo tenía 1 pacientes (8,1%) con riesgo moderado y un 66,8% presentaron entre 0 y 10 000 de UFC es decir no presentaron riesgo mientras que, en el grupo control el 75% de los pacientes presentó entre 10 000 y 100 000 de UFC, es decir presentaron riesgo bajo. En conclusión, los resultados sugieren que luego de cinco semanas de uso de pasta dental con Xilitol, este puede reducir los niveles de *S. mutans* en saliva <sup>(19)</sup>.

**Pérez (2013)** determinó el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans*. Para ello se realizó un estudio experimental y transversal, para lo cual se elaboraron en diferentes concentraciones extractos de *S. rebaudiana* con etanol de 70° (1,07%, 5%, 10%, 25%, 50% y 75%) y etanol de 30° (2,14%, 4,23%, 10,7%, 21,4%, 32,1% y 42,8%) los cuales fueron cultivados en 96 placas petri para medir el diámetro del halo de inhibición para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Se tomaron como control positivo a la penicilina y como control negativo al etanol. Los resultados demostraron que, la acción inhibitoria del extracto etanólico se presentó solo en la concentración de 1,07 mg/ml (47,6 mm) en etanol al 70° y de 2,14 mg/ml (1711 ±37 mm), 4,23 mg/ml (180 ± 9 mm), 10,7 mg/ml (153,6 ± 9 mm) en etanol al 30°, la penicilina mostró un diámetro de 15,8 mm y el etanol al 70° mostró un diámetro de 47, 6 mm mientras que el etanol a 30° obtuvo un diámetro de 3920,7 ± 95 mm); la acción bactericida se presentó a partir de la concentración

de 10 mg/ml ( $12,16 \pm 0,28$  mm), 25 mg/ml ( $13,16 \pm 0,28$  mm), 50 mg/ml ( $13,83 \pm 0,28$  mm), 75 mg/ml ( $18,66 \pm 2$  mm) en etanol de 70° y 42,8 mg/ml ( $8,83 \pm 0,28$  mm) en etanol de 30°, la penicilina mostró un diámetro de  $28 \pm 0,5$  mm y el etanol al 70° mostró un diámetro de 7 mm mientras que el etanol a 30° obtuvo un diámetro de 6,5 mm. En conclusión, el extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* posee efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans*<sup>(2)</sup>.

**Brambilla et al. (2014)** evaluaron el efecto del esteviósido y rebaudiósido A, mediante un estudio *in vitro* e *in vivo*. Para ello se elaboraron extractos de *S. rebaudiana* sobre la formación del biofilm de *S. mutans*, *in vitro* y las diferencias en la tendencia del pH final de la placa en 18 sujetos a los 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos después de un solo enjuague con 3 soluciones diferentes que contenían esteviósido, rebaudiósido A o sacarosa de manera aleatoria usando un electrodo de microtuch, *in vivo*. Los resultados muestran que en el estudio *in vitro* hubo crecimiento del biofilm en los 3 grupos de extractos, dándose en mayor medida en los pocillos que contenían sacarosa al 1% ( $429,23 \pm 59,93$  mm) y en menor medida para el esteviósido ( $146,92 \pm 5,24$  mm) y el rebaudiósido A ( $137,85 \pm 5,42$  mm), mientras que para el estudio *in vivo* se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de pH final de la placa entre los extractos de las 3 soluciones en los 7 puntos de tiempo, dándose un pH más bajo para la sacarosa ( $5,49 \pm 0,05$ ) a los 5, 10, 15 y 30 minutos y un pH más alto para el esteviósido ( $7,11 \pm 0,03$ ) y el rebaudiósido A ( $7,13 \pm 0,03$ ). En conclusión, el estudio provee evidencia para el uso potencial de extractos de *Stevia rebaudiana* como edulcorantes no cariogénicos<sup>(12)</sup>.

**Lingaraj et al. (2014)** compararon la eficacia del extracto acuoso y alcohólico de *Stevia rebaudiana* contra *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*, al compararlo con la clorhexidina, *in vitro*. Para ello se elaboró un extracto acuoso al 50% y otro etanólico de 70° al 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,1%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19% y 0,09% de *Stevia rebaudiana*, así mismo las cepas bacterianas de *S. mutans* y *L. acidophilus* se revivieron en medio de cultivo de agar con sangre que fueron diluidas en serie. Para la técnica

microbiológica se cortaron pocillos de 8 mm de diámetro de agar solidificado y se vertieron 100 microlitros de cada extracto y se incubaron a 37°C durante 48 horas, se usó como control positivo a la clorhexidina. La actividad antibacteriana de cada extracto se expresó como la media del diámetro de la zona de inhibición (en mm). Los resultados demostraron que al final de las 48 horas, la clorhexidina ( $26,5 \pm 0,42$  mm) mostró mayor tasa de inhibición contra *S. mutans* seguido por el extracto alcohólico ( $24,7 \pm 0,34$  mm) en concentraciones de 50%, 25% y 12,5% y finalmente la forma acuosa ( $22,8 \pm 0,27$  mm) en concentraciones de 50% y 25%; en cuanto al *L. acidophilus*, la clorhexidina ( $13,2 \pm 0,24$  mm) mostró mayor inhibición, sin embargo, se descubrió que el extracto alcohólico ( $12,3 \pm 0,12$  mm) en concentraciones de 50%, 25%, 12,5% y 6,25% eran lo suficientemente competente como la clorhexidina y mucho mejor que el extracto acuoso ( $10,8 \pm 0,21$  mm) en concentración de 50%. En conclusión, el efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* fue superior al de la forma acuosa e inferior a la clorhexidina <sup>(20)</sup>.

**Salli et al. (2016)** examinaron como los recuentos bacterianos adheridos y planctónicos de tres cepas de *S. mutans* y una cepa de *S. sobrinus* se ven afectados por la saliva artificial que contiene sacarosa, Xilitol o una combinación de los dos, usando un simulador dental que proporciona flujo continuo para reproducir el efecto de enjuague de la saliva en la cavidad oral. Para ello se preparó un modelo de biofilm in vitro a 37°C, se usaron discos de hidroxiapatita para imitar los dientes y una superficie adhesiva para las bacterias. Se prepararon las siguientes soluciones: saliva artificial (AS) con sacarosa al 1%, AS con 2%-5% de xilitol, AS con 1% de sacarosa y 2%-5% de Xilitol y AS simple. Al comienzo del proceso de simulación se bombearon 10 ml/h de AS simple por 30 minutos, para luego añadir los compuestos de ensayo al AS durante 3 horas a 20 ml/h, seguido de media hora de incubación, para finalizar con un enjuague final con 10 ml/h de AS simple durante una hora. Los discos de hidroxiapatita se recogieron y se tomaron muestras de los AS para determinar las cantidades de bacterias mediante reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa. Los resultados muestran que la presencia de xilitol al 2% ( $10^3$ ) dio como resultado una cantidad

disminuida de *S. mutans* tanto en la hidroxiapatita y la saliva artificial, pero el aumento de la concentración hasta el 5% no disminuyó de manera significativa los recuentos bacterianos, aunque la adición de 1% de sacarosa al Xilitol ( $10^6$ ) en la saliva artificial aumentó significativamente la cantidad de *S. mutans* en el recuento final. En conclusión, se demostró que la sacarosa promueve la colonización bacteriana y su proliferación, mientras que el Xilitol lo reduce <sup>(21)</sup>.

**Kishta-Derani et al. (2016)** determinaron el efecto antibacteriano de la *Stevia rebaudiana* sobre el desarrollo de caries al incorporarse a una dieta cariogénica en un modelo controlado, mediante el análisis de la dureza superficial del esmalte usando la prueba de dureza de Vickers (200g/10segundos) para detectar la desmineralización y remineralización y el recuento de colonias bacterianas visual para la cuantificación bacteriana, en el proceso de formación de lesiones cariosas. Además, se comparó la respuesta de la dosis de *Stevia rebaudiana* al 0.5% y 5%. Se tomó como control positivo al Xilitol al 5% y como control negativo al tampón de fosfato. Para ello se usaron 56 dientes bovinos que fueron sometidos a un régimen de tratamiento con el fin de imitar un ciclo de alimentación de tres comidas y en cada uno de estos vasos formadores de caries los dientes se sumergieron en la solución que contenía *S. rebaudiana* al 0,5% y 5%, xilitol al 5% o solución salina tamponada con fosfatasa durante 15 minutos durante 4 días para luego realizar un lavado mineral de forma intermitente, con el fin de imitar las acciones de la saliva a un pH de 6,89. Los resultados demostraron que el grupo de la *Stevia rebaudiana* al 5% obtuvo mayor pérdida de la dureza ( $p < 0,05$ ), seguido por la solución del tampón de fosfato, la *S. rebaudiana* al 0,5% y el grupo de Xilitol al 5% y respecto al número de bacterias, no hubo diferencias estadísticamente entre los grupos, pero la tendencia de datos mostró que el grupo tratado con *S. rebaudiana* tenía menos bacterias que el grupo con tampón de fosfato, pero más que el grupo de xilitol al 5%. En conclusión, la *Stevia* al 5% tiene un mayor efecto cariogénico en presencia de *S. mutans* al compararlos con la solución de *Stevia* al 0,5% y Xilitol al 5% <sup>(22)</sup>.

**Massón-Palacios et al. (2016)** compararon la eficacia de la *Stevia rebaudiana*, preparado como extracto acuoso al 2%, en fórmula industrial a 5mg/ml y en fórmula comercial a 5mg/ml sobre el crecimiento del *S. mutans* y *S. sanguis*. La evaluación de la actividad inhibitoria se utilizó la técnica de difusión de discos de Kirby y Bauer en las cuales se colocaron discos de fieltro impregnados de *Stevia* incubados por 48 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Los resultados demostraron que el extracto acuoso presentó mayor efecto inhibidor de crecimiento sobre *S. sanguis* (7,2 mm) al compararlo con los halos producidos por *S. mutans* (6,7 mm), en cuanto a la fórmula comercial logró mayor inhibición del crecimiento del *S. mutans* (11,3 mm) que sobre *S. sanguis* (9,5 mm), mientras que la fórmula industrial presentó mayor eficacia en la inhibición del crecimiento de ambos microorganismos, sobre *S. mutans* (13,8 mm) y sobre *S. sanguis* (11,3 mm). En conclusión, las tres sustancias de *Stevia* consiguieron un efecto inhibidor de crecimiento sobre las cepas estudiadas, de mejor manera sobre el *S. mutans* que sobre el *S. sanguis* <sup>(23)</sup>.

**Tovar-Huaynate et al. (2016)** demostraron la actividad antimicrobiana de la *Stevia* al compararla con el Xilitol, frente a *S. mutans*. Para ello se preparó el medio de cultivo utilizando Agar Mueller Hinton y se realizó el ensayo con técnica de agar difusión con bacterias y perforación en placa (4 pozos) con medida de 6 mm de diámetro para la posterior siembra con hisopos estériles del *S. mutans*, finalmente se evaluaron a las 24 y 48 horas después para determinar el efecto de estos extractos. Los resultados mostraron que la *Stevia* presentó halos de inhibición bacteriana de 13,2 mm a las 24 horas y 14,61 mm a las 48 horas, mientras que con el Xilitol se formaron halos de inhibición más pequeños, de 8,6 mm a las 24 horas y de 9,51 mm a las 48 horas de control. La clorhexidina al 2% logró los halos más grandes, de 25,86 mm. En conclusión, la *Stevia* tiene alta inhibición de la actividad microbiana frente al *S. mutans* en comparación al Xilitol <sup>(24)</sup>.

**Urbina (2016)** determinó la actividad antibacteriana in vitro de un enjuague bucal a base de extracto etanólico de hojas de *Stevia rebaudiana* sobre *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. La población bajo estudio estuvo conformada por 86 placas Petri que contenían diferentes concentraciones a base de extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* (1,07%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% usando etanol de 70° y 2,14%, 4,23%, 10,7%, 21,4%, 32,1%, 42,8% usando etanol de 30°) sobre *L.acidophilus* en concentración de  $3 \times 10^8$  UFC. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) luego de 24 horas y la susceptibilidad del *L. acidophilus* TCC 4356 frente al enjuague bucal de *Stevia* a diferentes concentraciones mediante el conteo de las colonias y la medición de los halos de inhibición del crecimiento respectivamente de cada una de las placas. Se usaron como controles: al enjuague bucal sin extracto etanólico, *L. acidophilus* sin tratamiento y clorhexidina al 0,12%. Los resultados demostraron que la acción inhibitoria del enjuague bucal a base de extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* se presentó a partir de la concentración de 1,07 mg/ml en el enjuague trabajado en etanol de 70° (0 UFC) y a partir de la concentración de 4,28 mg/ml, en el enjuague trabajado en etanol de 30° (0 UFC); mientras que la acción bactericida se presentó a partir de la concentración de 25 mg/ml en etanol de 70° ( $8,4 \pm 0,7$  mm) y nula en etanol de 30°. En conclusión, el enjuague bucal a diferentes concentraciones a base de extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* tiene actividad inhibitoria y antibacteriana sobre *Lactobacillos acidophilus* ATCC 4356 <sup>(25)</sup>.

**Eskandarian et al. (2017)** determinaron los efectos antimicrobianos (bactericidas) del tetrafluoride de titanio (TiF<sub>4</sub>), clorhexidina, fluoruro de sodio (NaF) y Xilitol sobre el *Streptococcus mutans* mediante un estudio *in vitro*. Para ello se obtuvieron *S. mutans* liofilizados que fueron cultivados en un medio de agar sangre y se realizó el ensayo de microdilución en caldo en un panel que incluía 96 pocillos, de los cuales se usaron los dos últimos como control positivo (solo inoculación de bacterias) y negativo (agua destilada) y se incubaron durante 48 horas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se consideró como la concentración más baja en la que no se detectó crecimiento del microorganismo

después del periodo de incubación y a la concentración bactericida mínima (CMB) como la concentración más baja en la que no se muestra ningún signo de crecimiento. Los resultados que la CMI de la solución de tetrafluoruro de titanio (9 mm) fue igual a la del fluoruro de sodio (15 mm), 12,5%; mientras que la clorhexidina (1 mm) obtuvo una CMI más baja de 6,25%. Evaluando el CMB para el  $\text{TiF}_4$  fue la más alta, 25%; mientras que el NaF fue similar al de la clorhexidina. El Xilitol no mostró efecto inhibidor y bactericida en cualquiera de sus concentraciones. En conclusión, se observó que la solución de tetrafluoruro de titanio tiene efectos bactericidas e inhibitorios contra el *S. mutans*, comparables con la clorhexidina y el fluoruro de sodio mientras que, el Xilitol mostró los resultados contrarios <sup>(14)</sup>.

**Brañez (2017)** determinó la actividad antibacteriana del extracto de *Stevia rebaudiana* frente a bacterias iniciadoras de la biopelícula dental (*Streptococcus sanguinis* y *Actinomyces viscosus*). Para lo cual primero se elaboró un extracto en concentraciones de 15 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml y 120 mg/ml y se desarrolló la prueba de sensibilidad de difusión en placa de agar con discos, previa activación de las cepas en Agar sangre y Agar Tripticasa de soya por 7 días en condiciones de anaerobiosis, para luego agregar un inóculo de 100 microlitros, estandarizado al 0,5 en la escala de Mc Farland y sembrarlo por diseminación para ser incubado a 37° por 48 horas en el caso de *S. sanguinis* y por 7 días en anaerobiosis al *A. viscosus*. Se tomó como control positivo a la clorhexidina al 0,12% y como control negativo al etanol 96°. Para los resultados se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento del microorganismo según la escala de Duraffourd: nula (inferior o igual a 8 mm), sensibilidad límite (9 a 14 mm), media (15 a 19 mm) y sumamente sensible (superior a 20 mm). En los resultados se pudo observar que frente al *A. viscosus* las concentraciones de extracto de *Stevia* al 60 mg/ml, 50 mg/ml y 30 mg/ml, y la clorhexidina presentaron sensibilidad límite (8,25 mm) mientras que el alcohol etanólico a 70° presentó un halo de 6mm. En conclusión, el extracto de *S. rebaudiana* no presenta actividad antibacteriana sobre las cepas de *S. sanguinis*, pero sí presenta poca actividad sobre las cepas de *A. viscosus* en las concentraciones de 30 y 50 mg/ml <sup>(26)</sup>.



**Guevara (2017)** demostró el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans* por el extracto hidroalcohólico de *Stevia* a diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%). Para ello se aplicó la técnica microbiológica de difusión en disco, para lo cual se obtuvo un total de 90 cajas Petri de Agar Mueller Hinton en el cual se sembró un inóculo de la bacteria con la técnica de hisopado completo en superficie en tres direcciones; luego del tiempo de incubación se procedió a la observación y medición de los halos de inhibición alrededor del disco. Se tomó como control positivo a la clorhexidina al 0,12% y control negativo al suero fisiológico. Los resultados demostraron que solo en la concentración del 100% se evidencia un halo de inhibición con un promedio de 9,33 mm, quedando en la zona de resistencia y solo en la clorhexidina se encontró en el rango de sensibilidad con un valor medio de 14,33 mm. En conclusión, se demostró que el extracto de *Stevia rebaudiana* no tiene efecto inhibitorio sobre *S. mutans* <sup>(27)</sup>.

### 3.2. Bases Teóricas

#### a) Xilitol:

##### a.1. Historia

El descubrimiento del Xilitol se le atribuye al químico alemán, premio nobel de química, Emil Fisher y a su alumno Rudolf Stahel en 1891 <sup>(28)</sup> y ha sido utilizado en la industria alimentaria como sustituto del azúcar desde finales de 1960 <sup>(29,30)</sup>, durante la Segunda Guerra Mundial en Finlandia que al estar en guerra con Rusia y Alemania no dispone de azúcar y finalmente recurre al descubrimiento de Fischer <sup>(29)</sup>, para ello extrajeron el azúcar de madera o azúcar de abedul, que a través del uso de la hidracina, aislaban un compuesto al que llamaron Xilitol, como resultado de la investigación de los derivados de la xilosa <sup>(30)</sup>.

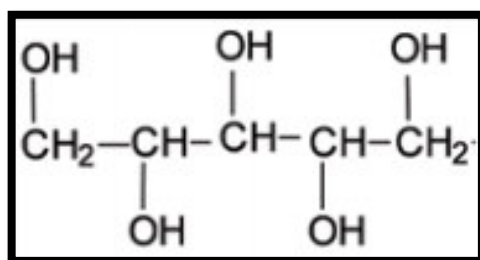
## a.2. Propiedades físico-químicas:

El Xilitol es un polialcohol natural de cinco átomos de carbono, que se encuentra en algunas plantas como levaduras, hongos, líquenes, frutas (fresas, frambuesas, arándanos) y vegetales (coliflor, maíz y abedul), pero en cantidades muy pequeñas (menores a los 900 mg/100 gr)<sup>(30,31)</sup>.

Se trata de un polvo blanco, cristalino, de sabor dulce, sin olor, altamente soluble en agua (64,2 g/ 100 ml) y en metanol<sup>(32,33)</sup>. Su poder edulcorante es de 0,8 a 1,1 veces superior al de la sacarosa con un valor calórico de 2,4 Kcal/g; 2,4 veces más dulce que el manitol y 2 veces más que el sorbitol<sup>(32)</sup>.

Presenta una agradable sensación refrescante debido al valor negativo del calor específico de disolución (- 34,8 cal/g), con un punto de ebullición de 216 °C y un punto de fusión de 94 °C<sup>(32,33)</sup>.

En la **Figura 1.** se muestra la fórmula estructural del Xilitol que es C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>, su masa molecular es de 152, 15 g/mol y presenta un punto de fusión en el rango de 93,4 a 94,7 °C<sup>(31-33)</sup>.



**Figura 1.** Estructura química de la molécula de xilitol.

Fuente: Lima et al., 2003<sup>(34)</sup>.

### a.3. Producción:

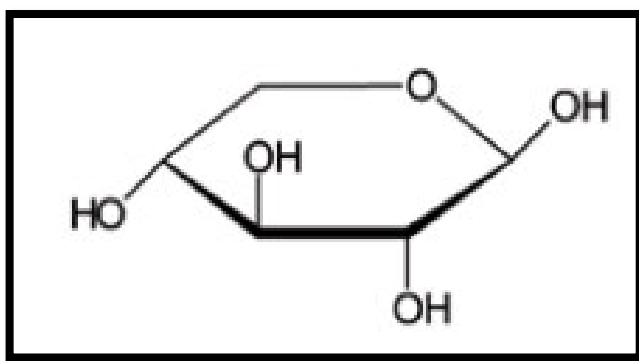
El Xilitol se encuentra naturalmente en pequeñas cantidades en frutas y verduras y bayas pero también es producida naturalmente por el cuerpo humano como parte del metabolismo normal e industrialmente es producido por hidrogenación química de la xilosa a partir de materiales vegetales ricos en xilano, como el abedul y la madera de haya <sup>(5,13,35)</sup>.

Se obtiene convencionalmente en la industria por hidrogenación catalítica de la xilosa a alta presión, usando catalizadores de níquel o níquel Raney. Es necesario tener en cuenta que se requieren de operaciones previas de purificación (intercambio iónico, decoloración y fraccionamiento cromatográfico) ya que el rendimiento y la calidad del proceso dependen de la pureza de la solución inicial de xilosa. Estos procesos aumentan el tiempo de proceso y encarecen el producto <sup>(36)</sup>. La estructura molecular de la xilosa se muestra en la **Figura 2**.

La producción biotecnológica de xilitol a partir de la xilosa presente en bagazo de caña de azúcar, eucalipto, paja de arroz y paja de trigo utilizando levaduras (*Candida guilliermondii*, *tropicalis*, *boidinni*, *parapsilosis* y las *Pichias*) y/o enzimas, busca disminuir los precios puesto que, los hidrolizados hemicelulósicos obtenidos de residuos agroindustriales, pueden competir con los procesos químicos tradicionales representando así una alternativa más económica <sup>(3,36)</sup>.

La producción anual de Xilitol es de 20,000 a 40,000 toneladas por año aproximadamente, con un valor económico que ya no es tan elevado como en años posteriores gracias a nuevos métodos que permiten su obtención de manera más eficaz. <sup>(5,35)</sup>.

Los factores que afectan la producción de Xilitol son: la concentración inicial de inóculo, tipo de sustrato, composición del medio de cultivo, temperatura, pH y transferencia de oxígeno <sup>(37)</sup>.



**Figura 2.** Estructura molecular de la D-xilosa.

Fuente: Felman y Weneger, 1985 <sup>(38)</sup>.

#### a.4. Usos:

El uso del Xilitol ha sido aprobado por la Federal Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos y The American Academy of Pediatric Dentistry como un agente edulcorante para uso humano desde la década de 1960, pues provee la misma cantidad de dulzor y consistencia que la sacarosa, pero con menor cantidad de calorías (2.4 Kcal/g comparado con 4 Kcal/g de la sacarosa), ideal para personas con sobrepeso o diabetes <sup>(5,35)</sup>.

Es usado en el área clínica en los pacientes con dificultad de metabolizar la sacarosa que se encuentren en la fase posquirúrgica por ser bien asimilado en infusiones, además mejora las propiedades bioquímicas de los huesos en caso de osteoporosis y previene la otitis aguda <sup>(39)</sup>.

Por sus múltiples beneficios, el Xilitol es industrialmente usado para endulzar gomas de mascar, pastillas, dulces, pastas dentales y jarabes para la tos <sup>(35)</sup>, y es por ello que los estudios proponen al Xilitol como alternativa de prevención para poblaciones vulnerables identificadas como especiales para el periodonto “PEPE” (niños discapacitados, mujeres en gestación, soldados en campaña, indígenas, pacientes con xerostomía, etc.) <sup>(40)</sup>. Se usa como edulcorante y agente de retención de humedad en cosméticos <sup>(36)</sup>.

También se consideró que la administración de Xilitol a través del conducto auditivo, reduce los problemas crónicos del oído en niños hasta en el 92% de los casos. Además de unirse en el intestino al calcio con el objetivo de facilitar su absorción y aumentar de esta manera la densidad ósea, por lo que en Estados Unidos ya es utilizado como terapia para combatir la osteoporosis <sup>(41)</sup>.

#### a.5. Aplicación en odontología:

En la cavidad oral, diversos estudios evalúan el potencial cariogénico de distintos edulcorantes que han arrojado evidencia sustancial de que el Xilitol es el edulcorante artificial más prometedor, puesto que tiene efecto sobre la formación de la biopelícula y sobre otros factores que causan la enfermedad como la interrupción de los procesos de producción de energía que reduce la adhesión y causa muerte celular. La evidencia hasta la fecha indica que los mecanismos de acción del Xilitol incluyen: Ausencia de degradación de productos finales por ácidos, la estimulación del flujo salival y el aumento de la capacidad buffer de la misma, así como la disminución de la acumulación de placa y bacterias cariogénicas <sup>(42)</sup>; también tiene un papel fundamental en la remineralización de sitios con descalcificación y la inhibición de la desmineralización del esmalte dental <sup>(3-5,10)</sup>.

Estudios demuestran que el Xilitol produce ambientes desfavorables para el desarrollo del *Streptococcus mutans* <sup>(10)</sup> puesto que, reduce la adherencia a tejidos orales al afectar la capacidad de formar biopelículas. Se concluye que la acción del Xilitol es ingresar al citoplasma bacteriano, interferir en la glucólisis e inhibir el crecimiento celular. La evidencia acumulada sugiere que el *Streptococcus mutans* es el organismo objetivo del Xilitol *in vivo*, puesto que, se reducen y se mantienen en niveles más bajos durante el consumo de Xilitol a largo plazo y, por consiguiente, al ser consumido por madres reduce la transmisión madre-hijo de estos microorganismos reduciendo el riesgo de caries en los niños <sup>(43)</sup>. El ciclo metabólico del Xilitol contra el *Streptococcus mutans* empieza cuando este transporta el azúcar a la célula para la elaboración de energía, convirtiendo así al Xilitol en Xilitol-5-

fosfato a través del sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa que al defosforilar a la molécula está es expulsada de la célula a un costo de energía que no proviene del metabolismo del Xilitol, lo que resulta en el desarrollo de vacuolas intracelulares y la degradación de la membrana celular con la posterior muerte celular de la bacteria <sup>(5,44,45)</sup>. Sin embargo la rápida eliminación del Xilitol de la cavidad oral es explicada por el aumento a corto plazo de las concentraciones de la misma en la saliva, por lo que en la actualidad se ha tratado de incluir al Xilitol dentro de productos de uso odontológico como barnices <sup>(13)</sup> ya que se observó que al adicionarlo al flúor <sup>(46)</sup> la desmineralización se previene, unido al cloruro de cetilpiridino <sup>(47)</sup> actúa como antibacteriano en la formación de la biopelícula en la superficie de dientes, y dentro de enjuagues a base de fluoruro de sodio con el objetivo de obtener efecto remineralizador en dientes temporales <sup>(48)</sup>, acompañando a la leche <sup>(49)</sup> en el desayuno de niños disminuye la prevalencia de caries dental, en endodoncia como potencial irrigante junto al farnesol <sup>(50)</sup> por tener propiedades antibacterianas y evitar la formación de la biopelícula.

El efecto antiinflamatorio del Xilitol se da al inhibir la producción de citoquina inducida por el liposacárido de *P. gingivalis* (LPS) que causa periodontitis junto a otros periodontopatógenos como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* <sup>(4)</sup>.

Se ha estudiado también el papel del Xilitol como inhibidor efectivo de *Candida albicans* que depende de una relación dosis-dependiente. Se ha reportado que concentraciones al 5, 18 y 10% de Xilitol son efectivos en la inhibición del crecimiento de *C. albicans*, *in vitro* <sup>(51)</sup>. También se ha reportado en estudios la reducción del número de bacterias acidúreas y acidógenas (como lactobacilos) y levaduras <sup>(52)</sup>.

#### a.6. Seguridad:

La frecuencia y duración de la exposición al Xilitol varía desde los 8 a 200 gramos por día, pero la Asociación Dental de California considera óptima para consumo total de 5-7 gramos por día, misma que se puede lograr por ejemplo al consumir goma de mascar o mentas con Xilitol de 3 a 5 veces al día por 5 minutos <sup>(5,53,54)</sup>.

La dosis recomendada para la prevención de la caries dental es de 6-10 gramos por día y para aquellos con disfunción temporomandibular o con dificultad para masticar, se deben usar caramelos de Xilitol <sup>(5)</sup>.

El Xilitol se metaboliza en el intestino grueso y actúa de forma similar a la fibra pudiendo causar en grandes cantidades evacuación blanda o tener efecto laxante. Sin embargo, las cantidades sugeridas para la reducción de la caries dental son mucho menores que las cantidades necesarias para causar resultados indeseados <sup>(53)</sup>.

Se han realizado estudios donde se prueba el uso diario de dosis altas de Xilitol (11,6g) por 6 meses usando como vehículos a gomas de mascar y pastas dentales, estos demuestran que durante este tiempo el tratamiento demostró ser efectivo como estrategia preventiva en niños con alto riesgo de caries, siendo seguro su uso <sup>(55)</sup>.

#### b) *Stevia rebaudiana*:

##### b.1. Clasificación taxonómica:

El género *Stevia*, propuesto por José de Cavanilles en 1797, engloba alrededor de 200 especies, las cuales crecen en América. Está incluida en la tribu *Eupatorieae* de la familia *Asteraceae*, a la cual pertenecen una de cada diez especies del reino vegetal <sup>(56)</sup>.

Dentro de la literatura se encuentra la clasificación taxonómica, según diferentes autores.

- Clasificación taxonómica, según Tamayo e Hincapié <sup>(57)</sup>.

Reino: Vegetal

División: Spermatophita

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotelidóneas

Subclase: Simpétala

Orden: Asterales

Orden: Campanulales

Familia: (Asteraceae) Compuestas

Género: Stevia

Especie: rebaudiana

Descriptor: Bertoni

Especie: Stevia rebaudiana Bertoni



- Clasificación taxonómica según Daciw <sup>(58)</sup>.

Súper reino: Eukaryota

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Súper-división: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Género: Stevia

Especie: Stevia rebaudiana

Nombre binomial: Stevia rebaudiana Bertoni

b.2. Descripción botánica:

La *Stevia rebaudiana* es una planta arbustiva perenne. Su tallo es recto, subleñoso, pubescente; durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo, llegando a producir hasta 20 tallos en tres a cuatro años. Puede alcanzar hasta 90 cm de altura en su hábitat natural y en los trópicos puede llegar a tener alturas superiores a 150 cm <sup>(59,60)</sup>.

La raíz es pivotante, filiforme y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie. Es el único órgano de la planta que no contiene el esteviósido de acuerdo a lo expuesto por De

Vargas en 1980. Se propagan asexualmente por esquejes, preferiblemente en arena gruesa (59,61).

Sus hojas son elípticas, ovales o lanceoladas, algo pubescentes; presentan disposición opuesta en sus estados juveniles, y alternas cuando las plantas llegan a su madurez fisiológica; previa a la floración posee bordes dentados, venticilada, con tricomas y se encuentran pegadas al tallo. La hoja es el órgano con mayor contenido del edulcorante (59,60).

La flor es hermafrodita, pequeña y blanquecina; su corola es tubular, pentolobulada, en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas (59).

La planta es auto incompatible (protandria), por lo que la polinización es entomófila; se dice que es de tipo esporofítico y clasificada como apomítica obligatoria (59).

El fruto es un aquenio que puede ser claro (estéril) u oscuro (fértil) y es diseminado por el viento. Se clasifica como una planta de día corto, situando el fotoperiodo crítico de 12 a 13 horas según el eco tipo (59,60).

### b.3. Historia y Origen:

Esta planta es un pequeño arbusto del norte de Paraguay, utilizado como endulzante natural desde tiempos precolombinos por indios nativos de la tribu guaraní. El Dr. Moisés Santiago Bertoni, director del colegio de Agricultura en Asunción, en 1887 descubrió la planta, siendo enormemente famosa para 1913. Actualmente la dispersión del fenómeno de la *Stevia rebaudiana* es enorme, se cultivó en Japón al inicio y es usada en muchos países fuera de Sudamérica, como china, Alemania, Malasia, Israel, y corea. En el Perú esta planta es cultivada fácilmente gracias a la gran cantidad de microclimas presentes en nuestro territorio (2,6,7,11,62).

En 1900 el químico paraguayo Ovidio Rebaudi, logró aislar dos principios activos: uno dulce y otro amargo. Posteriormente, estos compuestos fueron llamados esteviósido y

rebaudiosido, que son de 200 a 300 veces más dulces que la sacarosa, estables al calor y no fermentan <sup>(59)</sup>.

Se estima que hay más de 80 especies de *Stevia rebaudiana* que crecen de manera salvaje en todo el continente americano; la *Stevia rebaudiana* parece ser la única especie de todas ellas que posee la dulzura natural que la distingue. Se sabe que, en los años 50 en Paraguay, algunos médicos usaban la *Stevia rebaudiana* en bebidas con mate para el tratamiento de la diabetes, y gracias a las grandes propiedades que posee, es hoy objeto de estudio <sup>(6)</sup>.

#### b.4. Producción:

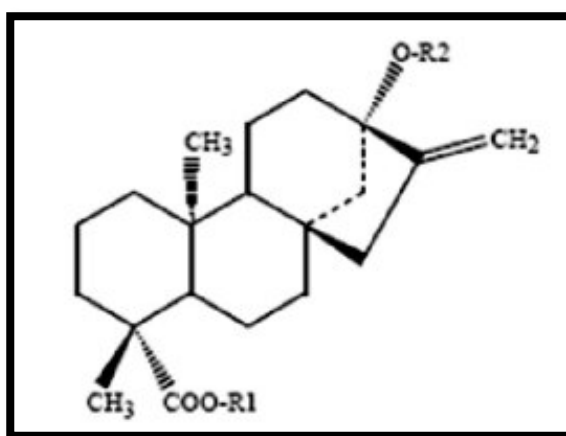
La reproducción sexual de *Stevia* presenta ciertas desventajas que pueden afectar de forma negativa la eficiencia del cultivo, esta situación ha propiciado el uso de técnicas de micropropagación para hacer más eficiente el proceso de multiplicación como la organogénesis <sup>(63)</sup>, o el cultivo en biorreactores en medios líquidos y biorreactores de inmersión temporal de vasos gemelos BIT <sup>(64)</sup>.

Esta planta requiere de días largos y alta intensidad solar (heliofanía). Los suelos óptimos para el cultivo de la *Stevia*, son aquellos con pH 6,5 a 7, de baja o nula salinidad, con mediano contenido de materia orgánica, de textura franco arenosa a franco, y con buena permeabilidad y drenaje. Esta planta no tolera suelos con exceso de humedad ni los de alto contenido de materia orgánica, principalmente por problemas fúngicos que pueden causar grandes pérdidas económicas <sup>(59)</sup>.

Actualmente se cultiva en Japón, Brasil, el sudeste asiático, Canadá y China, siendo este último el principal exportador de esteviósido <sup>(65)</sup>. Un 70% de la producción mundial de *Stevia* es destinada para procesar cristales de esteviósido, el otro 30% se destina a herbarios <sup>(66)</sup>.

#### b.5. Estructura química y composición:

Los glucósidos consisten de una estructura central, diperteno, con una variedad de radicales sustitutos los cuales incluyen a la glucosa, rhamnosa y/o xilosa. Su estructura central se presenta en la **Figura 3.**, donde los radicales  $R_1$  Y  $R_2$  pueden ser glucosa(glu), xilosa (xyl) o rhamnosa (rham) <sup>(67)</sup>.



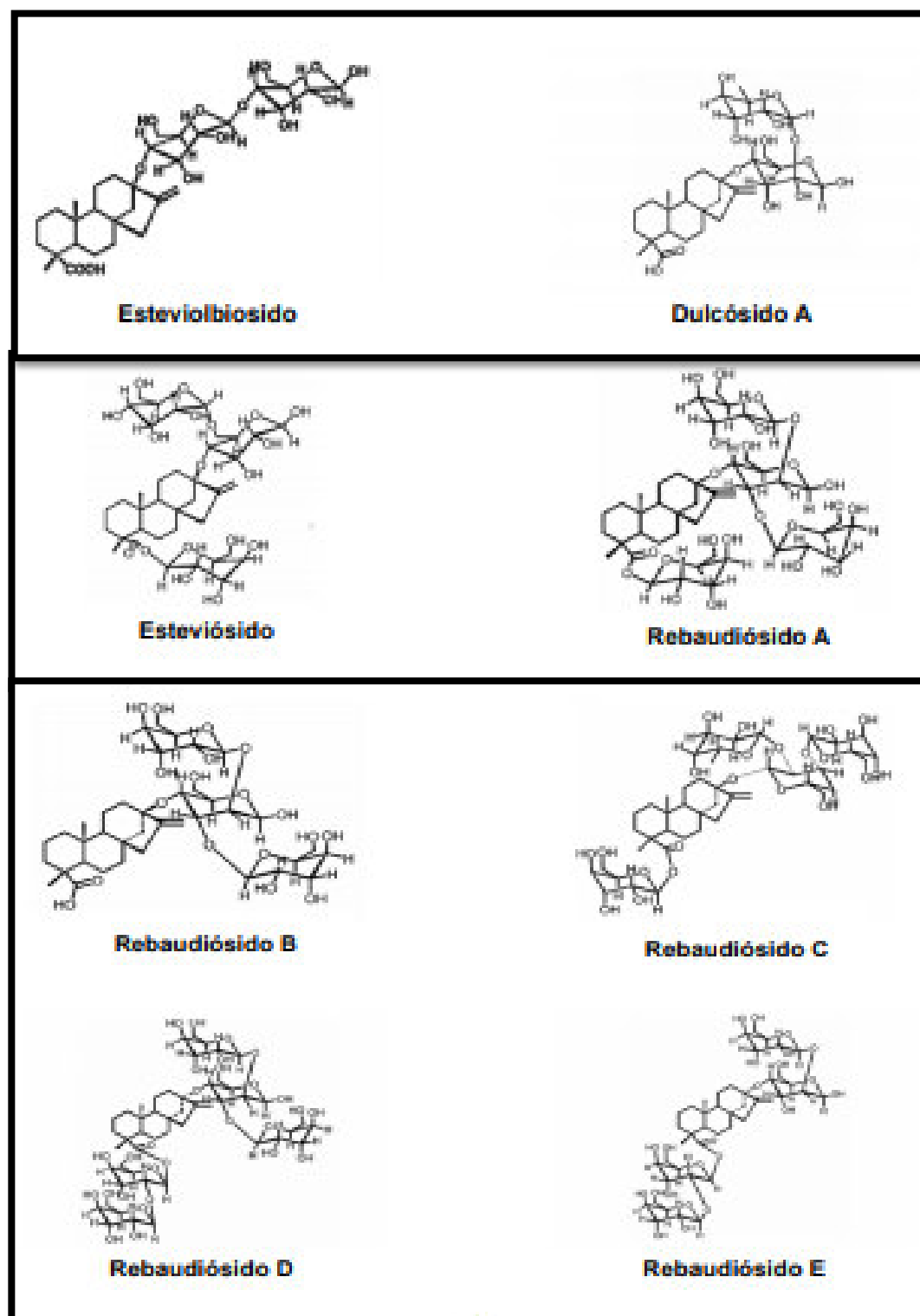
**Figura 3.** Núcleo de esteviol

Fuente: Woeler-Rieck et al., 2010 <sup>(68)</sup>.

Las hojas de *S. rebaudiana* contienen una mezcla compleja de dipertenos, triterpenos, taninos, estigmasterol, aceites volátiles y glucósidos dipertenos “dulces”. Los compuestos responsables del dulzor son los glucósidos de esteviol como esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E Y F y dulcósido; que se encuentran en las hojas de Stevia en porcentajes variables en función de la especie <sup>(66)</sup>.

Las hojas frescas de *Stevia* contienen una gran cantidad de agua (80 a 85%). Aparte de los componentes antes mencionados (glucósidos), las hojas contienen ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno, cromo, cobalto, magnesio, hierro, potasio, fósforo, riboflavina, tiamina, estaño, zinc, etc. entre los productos químicos encontrados están la apigenina, austroinilina, avicularin,  $\beta$ -sitoesterol, ácido caféico, campesterol, cariofileno, centaureidin, ácido clorogénico, clorofila, kaempferol, luteolina, quercetina, estigmasterol, entre otras <sup>(65)</sup>.

Las estructuras químicas desarrolladas para cada uno de los compuestos de la *Stevia rebaudiana* se presentan en la **Figura 4**.



**Figura 4.** Estructuras de los glucósidos presentes en hojas de *Stevia rebaudiana*.

Fuente: Rajasekaran et al., 2008 <sup>(69)</sup>

#### b.6. Propiedades:

Durante siglos, las tribus Guaraníes de Paraguay y Brasil han usado diferentes especies de Estevia, principalmente *Stevia rebaudiana*, como endulzante para contrarrestar el sabor amargo de los medicamentos a base de diferentes plantas y bebidas, y con fines medicinales que incluyen la regulación de la glicemia e hipertensión <sup>(65)</sup>.

La *Stevia*, es recomendada por los médicos para los diabéticos por sus propiedades hipoglucemiantes, también se elaboran cremas dérmicas como cicatrizantes. En el tratamiento de la obesidad, reduce la ansiedad por la comida y el deseo de ingerir dulces o grasas. Para el tratamiento de quemaduras, heridas, eccemas, seborrea, psoriasis, dermatitis <sup>(59)</sup>. Se reporta también como anticonceptivo <sup>(70)</sup>.

Su acción antioxidante ayuda a neutralizar los radicales libres (causantes del cáncer, enfermedades cardiovasculares y la diabetes) presentes en la sangre, actuando como captadores de oxígeno y no mostrando efectos secundarios tóxicos <sup>(66)</sup>.

Por su contenido de alcaloides contribuye a la defensa celular y valor hormonal, actuando como inmunoregulador, es decir, optimizando la respuesta inmune <sup>(66)</sup>.

En la industria es usado para endulzar: café, infusiones, chicles, caramelos, entre otros como sustituto del azúcar en bebidas de bajo contenido calórico, salsas y repostería <sup>(67)</sup>.

En la agricultura revitaliza a los microorganismos benéficos del suelo y recupera la fertilidad de estos. Aumenta el contenido de azúcar de frutos, de vitaminas minerales en hortalizas y aumenta la resistencia de las plantas al ataque de plagas y enfermedades <sup>(59)</sup>.

En la cosmetología ayuda en los tratamientos de celulitis, elaboración de dentífricos y enjuagues para la higiene bucal. Ayuda a eliminar manchas, suaviza arrugas y embellece la piel <sup>(59)</sup>.

#### b.7. Metabolismo de la *Stevia*:

Los glucósidos de esteviol pasan por el cuerpo sin producir ningún tipo de acumulación o impacto calórico significativos en el cuerpo. Estos se digieren y pasan a través del tubo digestivo alto completamente intactos. Las bacterias intestinales en el colon (*Bacterioides* spp) hidrolizan los glicósidos de esteviol en esteviol al cortar sus unidades de glucosa. Luego, el esteviol es absorbido por la vena porta, y principalmente por el hígado como glucorónido de esteviol, y, finalmente, es eliminado a través de la orina <sup>(66)</sup>.

#### b.8. Aplicación en Odontología:

El extracto de hojas de *Stevia* actúa como bactericida sobre *Streptococcus mutans* <sup>(66)</sup> y también posee efectos antivirales <sup>(71)</sup>. Estas propiedades únicas de la *Stevia rebaudiana* la hacen ideal como componente de enjuague bucal y pasta dental, puesto que se ha observado que realmente podría reducir la caries dental al retrasar el crecimiento de la biopelícula dental en la boca <sup>(6)</sup>. Vitery y Cols. realizaron un estudio cuyo objetivo general fue observar cómo afecta la *Stevia rebaudiana bertonii* en diferentes concentraciones sobre el crecimiento *in vitro* del *Streptococcus mutans* y del *Lactobacillus acidophilus* cultivados en agar Mueller Hinton, determinando el potencial anticariogénico de este edulcorante natural <sup>(6,12,72)</sup>.

También actúa como antiinflamatorio disminuyendo significativamente la producción de TNF-R e IL-1a, además de disminuir ligeramente la producción de óxido nítrico en células estimuladas con LPS y TPH-1. Al presentarse como agente inmunomodulador actúa a través de la estimulación de la inmunidad humoral, la función fagocítica y la inmunidad celular. Todo esto junto a la capacidad cicatrizante se convierte en un elemento contribuyente en el tratamiento de la enfermedad periodontal <sup>(62)</sup>.

#### b.9. Seguridad:

Hasta la fecha no se han reportado efectos adversos por el uso de *Stevia rebaudiana*, por lo que se reconoce que tiene un amplio margen de seguridad. Se sabe que en Japón se consumen hasta 100 toneladas al año, y no se han reportado reacciones adversas. En 1995 fue aprobada por la Agencia Americana de Drogas y Alimentos (FDA) como complemento dietético después de realizarse un estudio en Brasil, donde se mostró una disminución del 9,5% en las presiones sanguíneas diastólica y sistólica <sup>(6)</sup>.

Un estudio realizado en ratones mostró que tras un consumo crónico estos mostraron mutación reversa bacteriana, micronúcleo de médula ósea de ratón y malformación de espermatozoides de ratón <sup>(8)</sup>.

En 1985, se mostró que el consumo oral de esteviósido en cantidades elevadas como 550 mg/kg de peso corporal al día por 2 años no tuvo efectos tóxicos o cancerígenos en ratas. Los efectos biológicos e interacciones adversas con fármacos se desconocen, por lo que se sugiere que el metabolito de la aglicona, el esteviol, es mutagénico y bactericida en *Salmonella typhimurium* TM677 <sup>(73)</sup>.

#### c) Actividad inhibitoria:

Se refiere a la inhibición del crecimiento de bacterias que permanecen vivas, de tal manera que, al neutralizar el elemento bacteriostático, los microorganismos afectados se seguirán desarrollando <sup>(74)</sup>.

Según el diccionario enciclopédico de Larousse, se refiere al agente físico o químico que suspende la multiplicación de las bacterias, aunque mantiene su viabilidad. O de aquello que impide o reduce la actividad de las bacterias <sup>(75)</sup>.



#### d) Saliva:

##### d.1. Definición

La saliva es una secreción compleja proveniente de las glándulas salivales mayores en el 93% de su volumen y de las menores en el 7% restante, las cuales se extienden por todas las regiones de la boca excepto en la encía y en la porción anterior del paladar duro. Es estéril cuando sale de las glándulas salivales, pero deja de serlo cuando se mezcla con el fluido crevicular, detritus, microorganismos, células descamadas de la mucosa oral, etc <sup>(76)</sup>.

##### - Componentes de la saliva:

Los componentes de la saliva son, en su mayoría hidrofílicos; sin embargo, también presenta componentes hidrofóbicos. Los sólidos disueltos pueden ser diferenciados como: componentes orgánicos proteicos, componentes no proteicos y componentes inorgánicos o electrolitos <sup>(77)</sup>.

##### - Componentes orgánicos:

La concentración de proteínas es alrededor de 200mg/ml, lo cual representa aproximadamente el 3% de la concentración de proteínas del plasma. Incluye enzimas, inmunoglobulinas, glicoproteínas y albúminas. Como la alfa amilasa salival que hidroliza el almidón parcialmente en la boca, comenzando la digestión de los hidratos de carbono o la lisozima, que protege los dientes de la caries y de infecciones. También podemos encontrar contenido de mucina que produce la viscosidad necesaria para funciones lubricantes y de formación del bolo alimenticio que facilita la deglución a lo largo del tubo digestivo <sup>(77)</sup>.

- Componentes inorgánicos:

Se encuentran en forma iónica y no iónica. Encontramos electrolitos, siendo los más importantes: sodio, potasio, cloruro (que activan la alfa amilasa salival), bicarbonato y fosfato (función amortiguadora). También agua, que representa un 99,5%, que permite que los alimentos se disuelvan y se pueda recibir su sabor a través del sentido gusto <sup>(77)</sup>.

d.2. Flujo salival:

La secreción diaria oscila entre 500 y 700 ml, con un volumen medio en la boca de 1,1 ml. Su producción está controlada por el sistema nervioso autónomo. En reposo, la secreción oscila entre 0,25 y 0,35 ml/mm y procede sobre todo de las glándulas submandibulares y sublinguales. Ante estímulos sensitivos, eléctricos o mecánicos, el volumen puede llegar hasta 1,5 ml/mm. El mayor volumen salival se produce antes, durante y después de las comidas, alcanza su pico máximo alrededor de las 12 del mediodía y disminuye de forma muy considerable por la noche, durante el sueño. El 99% de la saliva es agua mientras que el 1% restante está constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas. La saliva es un buen indicador de los niveles plasmáticos de diversas sustancias tales como hormonas y drogas, por lo que puede utilizarse como método no invasivo para monitorizar las concentraciones plasmáticas de medicamentos u otras sustancias <sup>(76)</sup>.

En el hombre, a diferencia de los animales anestesiados, las glándulas salivales siempre secretan bajo condiciones de alerta, aun en ausencia de estímulos obvios, aunque es difícil asegurarse de que no están presentes ciertos estímulos, no detectados. El flujo en reposo de la saliva puede estudiarse por medio de una cánula de Lashley, en personas que se han acostumbrado a usarla <sup>(78)</sup>.

La Saliva puede recolectarse en dos formas:

Como saliva en reposo o no estimulada: Se define como aquella que es producida espontáneamente, en ausencia de estímulos salivales exógenos o farmacológicos y en situación de relajación. El promedio de la velocidad de flujo salival no estimulada oscila entre 0,3 a 0,4 ml/min y sus valores pueden variar entre 0,08 y 1,83 ml/min <sup>(79)</sup>.

O como saliva estimulada: Es la que se obtiene después de haber sometido al sujeto a estímulos por una variedad de agentes (gustatorios y masticatorios) como cera o parafina. Difiere de la de reposo no solamente por la cantidad, sino también por presentar cambios en su composición. El promedio de la velocidad de flujo salival estimulada es de 1 a 2 ml/min, encontrándose en una variación de 0,2 a 5,7 ml/min <sup>(79)</sup>.

Y finalmente como saliva total: La saliva total es un compuesto de secreciones de las glándulas parótidas, submaxilares y sublinguales. Las numerosas glándulas mucosas menores también contribuyen al lago salival, pero también el líquido de la hendidura gingival y el exudado de la mucosa bucal. La saliva total contiene también células epiteliales descamadas, leucocitos, bacterias y restos alimentarios <sup>(79)</sup>.

#### d.3. Flora mixta salival:

##### Origen y desarrollo de la microbiota oral:

La composición de la microbiota oral varía desde el nacimiento y durante toda la vida influenciada por los factores microbianos y no microbianos que conforman la sucesión autogénica y alogénica. El mayor ejemplo de sucesión autogénica está dado por el desarrollo de la biopelícula dental, considerada como una "comunidad ecológica" <sup>(80)</sup>.

El primer paso para el establecimiento de la biopelícula es la adherencia microbiana mediada por distintos mecanismos inespecíficos y específicos a través de la interrelación entre adhesinas y receptores. A la adhesión de los primeros colonizadores le siguen fenómenos de

co-agregación, lo que constituye el denominado "mosaico de microorganismos", el cual varía de acuerdo con las propiedades biológicas y físicas del sitio <sup>(80)</sup>.

#### Flora Microbiana:

La cavidad bucal está compuesta de muchas superficies, cada una de ellas recubierta por una gran cantidad de bacterias, la biopelícula bacteriana proverbial. Algunas de estas bacterias han sido implicadas en enfermedades bucales como la caries y la periodontitis, que están entre las infecciones bacterianas más comunes en los seres humanos <sup>(81)</sup>.

Entre los microorganismos que constituyen la microbiota autóctona de la cavidad bucal, se destacan microorganismos pertenecientes a los *phylum: Firmicutes* y *Actinobacteria* entre los grampositivos y los que se encuentran dentro de los *phylum Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Synergistes* y *Proteobacterias* que agrupan a los microorganismos considerados actualmente como gramnegativos <sup>(80)</sup>.

Los cocos grampositivos, fundamentalmente *Streptococcus viridans* del *phylum firmicutes*, son los más aislados en los ecosistemas bucales en estado de salud. Los *Streptococcus* del grupo mutans (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*) son los microorganismos más asociados con caries dental <sup>(80)</sup>.

También se identifican otras formas cocoideas, anaerobias estrictas, como *Veillonella* y elementos filamentosos polimorfos, como *Lactobacillus*, *Actinomyces* y *Bifidobacterium* <sup>(80)</sup>.

La microbiota salival está compuesta por bacterias indígenas que son específicas para cada persona exhibiendo estabilidad a largo plazo, pero cambios estructurales en cavidad bucal como pérdida de los dientes, gingivitis, alveolitis, periodontitis pueden producir cambios ecológicos que la afectan directamente <sup>(82)</sup>. Estudios recientes con enfoques moleculares, han concluido en el carácter transitorio de la microbiota salival que depende de la composición de los otros ecosistemas primarios. En general predominan los cocos grampositivos anaerobios facultativos (en torno al 44%), los cocos gramnegativos anaerobios estrictos

como *Veillonella* spp. (alrededor del 15%), y los bacilos anaerobios facultativos grampositivos (aproximadamente un 15%), destacando las especies de *Actinomyces* <sup>(83)</sup>.

e) Extracto etanólico:

El extracto etanólico se obtiene por la maceración o percolación de una planta desecada de origen vegetal en etanol (alcohol etílico), por lo que sólo extraeremos los compuestos solubles en este alcohol, seguido de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico <sup>(84)</sup>.

El alcohol es el mejor solvente para extraer y preservar los compuestos presentes en las plantas y que no son solubles en agua como aceites, resinas, bálsamos y muchos alcaloides. El alcohol es un conservante natural que alarga la vida de los extractos y además facilita la absorción de los compuestos <sup>(85)</sup>.

Se puede obtener por maceración, siendo una extracción que se realiza a temperatura ambiente, que consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua o etanol, se prefiere el etanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos) hasta que este penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no se atacado con el disolvente; en este se colocará el material vegetal con el disolvente y tapado en reposo por un periodo de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto <sup>(86)</sup>.

O por percolación, conocido también como lixiviación, que se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico, y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. No es apropiado para resinas o materiales que se inflamen <sup>(86)</sup>.

f) Solución acuosa:

La solución acuosa es una preparación líquida que contiene una o más sustancias químicas solubles disueltas en agua <sup>(87)</sup>.

En las preparaciones acuosas se aprovecha el poder de extracción del agua mediante técnicas como infusión, decocción, maceración, percolación y destilación <sup>(85)</sup>.

En este tipo de soluciones existe un solvente y soluto. Siendo en este caso el solvente el agua y el soluto la sustancia que se encuentra disuelta en el agua. La concentración se expresa en función de la cantidad de soluto en una masa o volumen de solución, o la cantidad de soluto disuelto en una masa o volumen de solvente (Molaridad, molalidad, normalidad, porcentaje en masa (volumen), ppm, ppb) <sup>(88)</sup>.

g) Recuento de unidad formadora de colonias (UFC) en placa:

La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; este microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC <sup>(89)</sup>.

Esta consiste en realizar diluciones seriadas 1:10 y extender 0,1 mL de cada dilución en una placa; estas placas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento. Tiene la ventaja de tener un buen límite de detección <sup>(90)</sup>.

En este método de recuento de microorganismos vivos, son inevitables los errores, especialmente al examinar muestras pequeñas, puesto que es posible que muchas bacterias presentes en la muestra no puedan crecer en las condiciones elegidas (pH, temperatura, medio de cultivo, tiempo, etc.) <sup>(91)</sup>.

Se toman en cuenta únicamente aquellas placas que tengan entre 30 y 300 colonias, puesto que este número de colonias es estadísticamente representativo y aquellas placas que tengan más de 300 colonias se reportan como “incontables” <sup>(92)</sup>.

El resultado debe ser expresado en UFC/g o UFC/ mL <sup>(91)</sup>:

$$\text{UFC/g o UFC/ mL} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias en placa (30 y 300) x inverso de la dilución}}{\text{mL de la muestra sembrada}}$$

### 3.3. Hipótesis:

#### 3.3.1. Hipótesis general:

El extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70° y la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol poseen actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro*.

#### 3.3.2. Hipótesis específicas:

- El extracto etanólico al 1,07 mg/ml de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70° posee actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro* a las 24 horas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).
- La solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol posee actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro* a las 24 horas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).
- El extracto etanólico al 1,07 mg/ml de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70° posee mayor actividad inhibitoria que la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol sobre los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro* a las 24 horas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

### 3.4. Operacionalización de variables

Variable independiente:

Extracto etanólico de la *Stevia rebaudiana*

Solución acuosa de Xilitol



Variable dependiente:

Efecto inhibitorio de la Stevia rebaudiana

Efecto inhibitorio del Xilitol

Variables control:

Control positivo: Clorhexidina al 0.12%

Control negativo: etanol a 70°

Variables modificadoras:

Tiempo de estimulación de flujo salival

Bacterias orales

Cuadro de operacionalización de variables:

	Variable	Definición	Dimensión	Indicador	Escala	Valor
Variable Independiente	Edulcorante Natural	Sustancia que se encuentra en la naturaleza, que sirve para proveer de sabor dulce.	<i>Stevia rebaudiana Bertoni</i>	Extracto etanólico	Nominal	<i>Stevia rebaudiana</i> al 1,07 mg/ml en etanol a 70°
			Xilitol	Solución acuosa		Solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol
Variables dependiente	Actividad Inhibitoria	Es la inhibición en el crecimiento de los microorganismos debido a la presencia del extracto etanólico de <i>Stevia rebaudiana</i> y la solución acuosa de Xilitol.		<p>Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)</p> <p>UFC/ml= número de colonias x factor inverso de dilución / volumen de siembra</p>	Razón	UFC/ml
Variables modificantes	Tiempo de estimulación de flujo salival	Duración en minutos a los cuáles son expuestos los pacientes durante la recolección de saliva estimulada.		Minutos expuestos a la parafina.	Razón	5 min
	Bacterias Orales	Bacterias presentes en la saliva.		Cantidad de saliva recolectada	Razón	mL

#### IV. METODOLOGÍA

##### 4.1. Tipo de investigación:

Se trata de una investigación de tipo:

- **Experimental:** El investigador controla la acción de las variables en el laboratorio, y se usan controles positivos y negativos.
- **Transversal:** Debido a que, en el tiempo, el registro de información en la población se realizó una vez.
- **Prospectivo:** Desde efectuado el experimento, la toma de información se realizó hacia el futuro.
- **In vitro:** El estudio se llevó a cabo en condiciones de laboratorio.

##### 4.2. Población y muestra de estudio:

###### **Población de estudio:**

La población bajo estudio está conformada por el conjunto de placas de Petri con Agar Tripticasa Soya TSA, que contenían al extracto etanólico de la *Stevia rebaudiana* a una concentración de 1,07 mg/ml en etanol a 70° y con solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol.

###### **Unidades de análisis:**

La unidad de análisis lo constituye la placa de Petri con Agar Tripticasa Soya TSA.

### Tamaño de muestra:

Para determinar el tamaño de muestra se hizo uso de la fórmula para comparar dos o más medias, para hipótesis bilateral:

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 * (DE^2)}{(d)^2}$$

Dónde:

n: Tamaño de la muestra.

$\alpha$ : Probabilidad de cometer error tipo I.

$\beta$ : Probabilidad de cometer error tipo II.

Z: Valor estándar de la distribución normal asociada a un tipo de error.

DE: Desviación estándar.

d: Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar.

Considerando los requerimientos de una confianza del 95% ( $\alpha=0,05$ ,  $Z=1,96$ ) y una potencia en la prueba del 80% ( $\beta=0,20$ ,  $Z=0,84$ ), para  $DE/d = 0,50$ .

$$n = 2 (1,96 + 0,84)^2 (0,5)^2 = 3,92$$

Con estos valores se determinó una muestra de 4 repeticiones para cada grupo de estudio.

Por lo que se debía analizar como mínimo 20 placas de Petri con Agar Tripticasa soya TSA distribuidos en 5 grupos, de extracto de *Stevia rebaudiana*, solución acuosa de Xilitol, etanol a 70°, clorhexidina al 0,12% y caldo BHI infusión cerebro corazón, y luego se realizó el recuento del número de colonias (UFC).

### **Selección de Muestra:**

#### Criterios de inclusión:

Para placas de Petri con Agar Tripticasa soya TSA:

- ✓ Placas de Petri con Agar Tripticasa soya TSA con extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* y solución acuosa de Xilitol con siembra adecuada de flora mixta salival.
- ✓ Placas de Petri con Agar Tripticasa soya TSA que después del proceso de incubación, no muestren contaminación por otros microorganismos. (Hongos).

Para recolección de flujo salival:

- ✓ Personas sin enfermedad sistémica.
- ✓ Personas que no hayan consumido antibióticos por los últimos 3 días antes del recojo de la muestra.
- ✓ Personas con enfermedad de caries dental activa.
- ✓ Personas entre los 18 y 60 años de edad.

#### Criterios de exclusión:

Para placas de Petri con Agar Tripticasa soya TSA:

- ✓ Placas de Petri con Agar Tripticasa soya TSA que después del proceso de incubación, muestren contaminación por otros microorganismos. (Hongos).

Para recolección de flujo salival:

- ✓ Personas que presenten halitosis.
- ✓ Personas que presenten candidiasis o estén en tratamiento para la misma.

#### 4.3. Procedimientos y técnicas:

Obtención del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* Bertoni:

Recolección e identificación taxonómica:

Las hojas de *Stevia rebaudiana*, fueron recolectadas de la localidad de Chanchamayo, provincia de San Ramón, región de Junín y empaquetado por la distribuidora HIGHLAND COFFEE. Se llevaron al Museo de Historia Natural para su clasificación taxonómica.

En la **Tabla N°1**, se puede observar los resultados de la identificación taxonómica realizada por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos que confirma que se trata de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Anexo 1).

**Tabla N°1. Clasificación sistemática de la *S. rebaudiana* Bertoni según Cronquist (1988).**

Nombre vulgar	Stevia
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Stevia
Especie	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni)

FUENTE: MUSEO DE HISTORIA NATURAL <sup>(93)</sup>.

#### Preparación del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* Bertoni:

Se pesaron 455g de las hojas secas de *Stevia Rebaudiana* y se colocaron en un envase de color ámbar con boca ancha, para su posterior humectación con etanol al 96% solución hidroalcohólica (7:3), lográndose así la extracción por maceración a temperatura ambiente, por 2 semanas.

El producto se filtró colocándose diferentes barreras mecánicas como algodón, redes y tela, para finalmente filtrar con papel filtro Whatman N°40 de 125 mm de diámetro, con el fin de obtener un extracto libre de restos.

La solución resultante fue llevada a la incubadora para evaporar el solvente a sequedad a temperaturas entre 37°C y 40°C. De lo cual al finalizar se obtuvieron 52,52 gr de residuo seco de *Stevia rebaudiana*.

Preparación del extracto etanólico al 1,07 mg/ml de *Stevia rebaudiana* Bertoni en etanol de 70°:

Del residuo seco se preparó la concentración al 1, 07 mg/ml disuelta en etanol de 70°. Para ello primero se procedió a pesar 0,107 mg del extracto de *Stevia rebaudiana* en una balanza calibrada (soluto) y se preparó 10 ml de etanol de 70° (solución hidroalcohólica 7:3) como solvente, con el objetivo de obtener la disolución a la concentración deseada (**Figura 5**).

Obtención de la solución acuosa a 1mg/ ml de Xilitol:

Compra del producto:

El Xilitol fue adquirido en forma de polvo de la empresa HYLEN CO., LTD, China, la cuál es distribuida en el Perú por la empresa ALTERNATIVA QUÍMICA.

Se presenta a continuación, el análisis químico del Xilitol Fine Powder (**Tabla N°2.**), realizada por la empresa Hylen CO., LDT en el año 2017 y distribuida por Alternativa Química EIRL. Producto utilizado para el estudio (Anexo 2).

**Tabla N°2. Composición Química del Xilitol Fine Powder**

Nombre	Xilitol (polvo)
Apariencia	Polvo blanco cristalino
Ensayo (base seca)	99,73
Otros polioles	0,27
Pérdida por secado	0,08
Residuos en combustión	0,020
Reducción de azúcares	0,014
Metales pesados	< 0,0005
Arsénico	< 0,00005
Niquel	0,000008
Plomo	0,000022
Sulfato	< 0,002
Cloruro	< 0,001
Punto de fusión en C°	93,4 C°
pH en solución acuosa	6,08
Recuento total de placas (UFC/g ≤)	< 10
Coliformes (MPN /g)	< 3
Salmonela	No detected
Levadura y moho (UFC /g)	< 10

**FUENTE: HYLEN CO., LDT CHINA <sup>(94)</sup>.**



Preparación de la solución acuosa de Xilitol en dilución al 100 %:

Se procedió a colocar 10 mg de Xilitol en polvo en una balanza calibrada (soluto) el cuál fue diluido en 10 ml de agua destilada (dilución al 100%) con el fin de obtener una concentración de 1mg/ml (**Figura 5.**).

Obtención de la flora mixta salival:

Antes de tomar la muestra, se solicitó a los 4 pacientes haberse cepillado los dientes por lo menos 2 horas antes de la prueba, para no tener restos de alimentos en la saliva recolectada.

Se les entregó un pedazo de parafina con el fin de estimular la saliva a través de la mordida de la misma, alrededor de 5 minutos. La saliva resultante fue recolectada en frascos estériles, con el fin de obtener flora mixta salival.

Se debe tener en cuenta que la cantidad de saliva estimulada varió de acuerdo al paciente.

Controles:

Para determinar el efecto inhibitorio se utilizó como control negativo al caldo BHI infusión cerebro corazón y como controles positivos a la Clorhexidina al 0,12% y etanol a 70°.

Estudio microbiológico:

Los materiales (**Figura 6.**) usados fueron colocados sobre la mesa de trabajo del Laboratorio de Microbiología.

Se prepararon 10 ml de las disoluciones de *Stevia rebaudiana* Bertoni y xilitol, así mismo, 10 ml de los controles (etanol a 70° y clorhexidina al 0,12%) (**Figura 7.**).

Se cultivó 0,2 ml de saliva estimulada en 0,8 ml de cada solución preparada (Stevia rebaudiana, Xilitol, etanol a 70°, clorhexidina al 0,12% y Caldo BHI infusión cerebro

corazón) en tubos de ensayo cerrados herméticamente. Se llevaron a incubación bajo condiciones de aerobiosis a 37°C por 24 horas (**Figura 8.**).

#### Cultivo en Placas de Petri con Agar Tripticasa soya TSA:

A las 24 horas, los tubos de ensayo presentaban diferentes grados de turbidez por lo que se procedió a la dilución seriada 1:10 hasta alcanzar el factor de dilución  $10^{-2}$  (0,1 ml de muestra y 0,9 ml de suero fisiológico).

Los tubos con las suspensiones fueron girados entre las manos durante 30 segundos con el fin de homogenizarla y proceder al sembrado de 0,1 ml en placas de Petri con Agar Tripticasa soya TSA, usando el método de siembra por disseminación con ayuda de la espátula de Drigalsky de cabezal recto. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama de un mechero, usando solo materiales estériles y se efectuaron 2 repeticiones por solución de *Stevia rebaudiana* y Xilitol, respectivamente. Se incubaron las placas de Petri en la estufa bajo condiciones de aerobiosis a 37°C por 24 horas para el posterior recuento de colonias. Se sembraron un total de 21 placas (**Figura 9.**).

Determinación de la actividad inhibitoria *in vitro* del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* Bertoni y la solución acuosa de Xilitol – Método de recuento de unidades formadoras de colonias (UFC):

El método de recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) determina el número de microorganismos en una muestra en relación a las colonias que forman las UFCs (Unidades Formadoras de Colonias) <sup>(96)</sup>.

Se contarán aquellas colonias desarrolladas cuya morfología sea <sup>(97)</sup>:

- Forma: puntiforme y circular
- Borde: entero, redondeado, ondulado.
- Color: amarillento

- Elevación: plana
- Superficie: lisa y opaca
- Característica óptica: Opaca

Se observó el crecimiento bacteriano y se identificaron las colonias que cumplieran las características morfológicas mencionadas para posteriormente proceder al conteo de las colonias mediante observación directa con una lupa con 10x de ampliación.

#### **Unidades formadoras de Colonias por ml**

$$\text{UFC/ml} = C \times D / V$$

C: número de colonias en placa

D: factor inverso de la dilución ( $10^{-2}$ )

V: volumen de siembra (100μl)

#### **4.4. Recolección de datos:**

Los pacientes fueron informados a través de un consentimiento informado (Anexo 3) sobre los objetivos del estudio, el rol como participantes dentro del estudio, la confidencialidad de los datos y la resolución de dudas. Se les pidió que al estar de acuerdo con participar escribieran su nombre y colocaran su firma.

Se utilizó una ficha de recolección de datos del paciente (Anexo 3) donde se registraron datos de filiación (Nombre y Sexo) y si sufría de alguna enfermedad sistémica por lo que hubiera tenido que consumir antibióticos durante los 3 días previos al examen clínico, además se les realizó un examen odontológico previo para poder observar si el paciente tenía

lesiones cariosas, sufría de halitosis o candidiasis, mediante la observación y olfacción. Todos estos datos se recolectaron con el objetivo de observar si el paciente cumplía con los criterios de inclusión y de exclusión.

Se utilizó una segunda ficha de recolección (Anexo 4) en la cual se anotaron los resultados obtenidos del recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

#### 4.5. Procesamiento y análisis de resultados:

Realizado la recolección de datos y llenado en la base de datos empleando el programa Microsoft Excel para su posterior interpretación en el programa estadístico Stata versión libre 12.0, se procedió a obtener la estadística descriptiva concerniente, se presentaron las variables y se calcularon medidas de tendencia central y dispersión. Se realizarán pruebas de normalidad de Shapiro - Wilk. Para la estadística inferencial, se usarán pruebas paramétricas como el ANOVA o no paramétricas como el test de Kruskal – Wallis para poder probar la hipótesis, además de pruebas post hoc para la evaluación de diferencias significativas estadísticamente entre grupos como el Bonferroni para muestras independientes en caso de ser paramétrica o el Test de Dunn en caso de ser no paramétrica.

Los resultados serán presentados narrativamente en cuadros y gráficos agrupándolos por variables y áreas de análisis que den respuesta a los objetivos del estudio.

Se trabajó con un nivel de significancia del 5% ( $p < 0.05$ ), con un intervalo de confianza del 95% y una potencia del 20%.

## V. RESULTADOS

Se realizaron 21 ensayos válidos de los cuáles 6 pertenecían a la solución acuosa a 1m/ml de Xilitol, 6 al extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, 3 a la clorhexidina al 0,12%, 3 al etanol a 70° y 3 al caldo BHI infusión cerebro corazón. Se puede observar el resultado en la **Figura 10., Figura 11., Figura 12. y Tabla N°3.**

**Tabla N°3.** Recuento de Unidades formadoras de colonias (UFC/ml) del extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol, Clorhexidina al 0,12%, etanol a 70° y caldo BHI infusión cerebro corazón sobre Flora mixta salival a las 24 horas.

UFC/ml	Soluciones	Stevia		Xilitol		Clorhexidina	Etanol	Caldo BHI
		1	2	1	2			
	Muestra 1	0	0	125 x 10 <sup>-4</sup>	1430 x 10 <sup>-4</sup>	0	0	212 x 10 <sup>-4</sup>
	Muestra 2	0	0	1976 x 10 <sup>-4</sup>	897 x 10 <sup>-4</sup>	0	1	2524 x 10 <sup>-4</sup>
	Muestra 3	0	0	735 x 10 <sup>-4</sup>	427 x 10 <sup>-4</sup>	0	0	1854 x 10 <sup>-4</sup>

**Fuente:** Investigación

**Elaboración:** Bach. Maisely Galindo

Con los datos obtenidos se procedió al análisis estadístico descriptivo:

Se puede observar de los datos obtenidos en la **Tabla N°4.** Que la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol y el Caldo BHI infusión cerebro corazón presentan una mediana de 816 y 1854 unidades formadoras de colonias, mientras que el extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, la Clorhexidina al 0,12% y el etanol a 70° presentan 0 unidades formadoras de colonias. También se observa que los datos presentan distribución normal para el extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70° y la Clorhexidina al 0,12%.

**Tabla N°4.** Medidas de tendencia central y dispersión de las unidades formadoras de colonias por ml de del extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol, Clorhexidina al 0,12%, etanol a 70° y caldo BHI infusión cerebro corazón sobre Flora mixta salival a las 24 horas.

<b>Soluciones</b>	<b>Media</b>	<b>Mediana</b>	<b>DE</b>	<b>IQR</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>
Stevia	0	0	0	0	0	0
Xilitol	931,66	816	657,91	1003	1976	125
Clorhexidina	0	0	0	0	0	0
Etanol	0,33	0	0,58	1	1	0
Caldo BHI	1530	1854	1189,57	2312	2524	212

DE: Desviación estándar

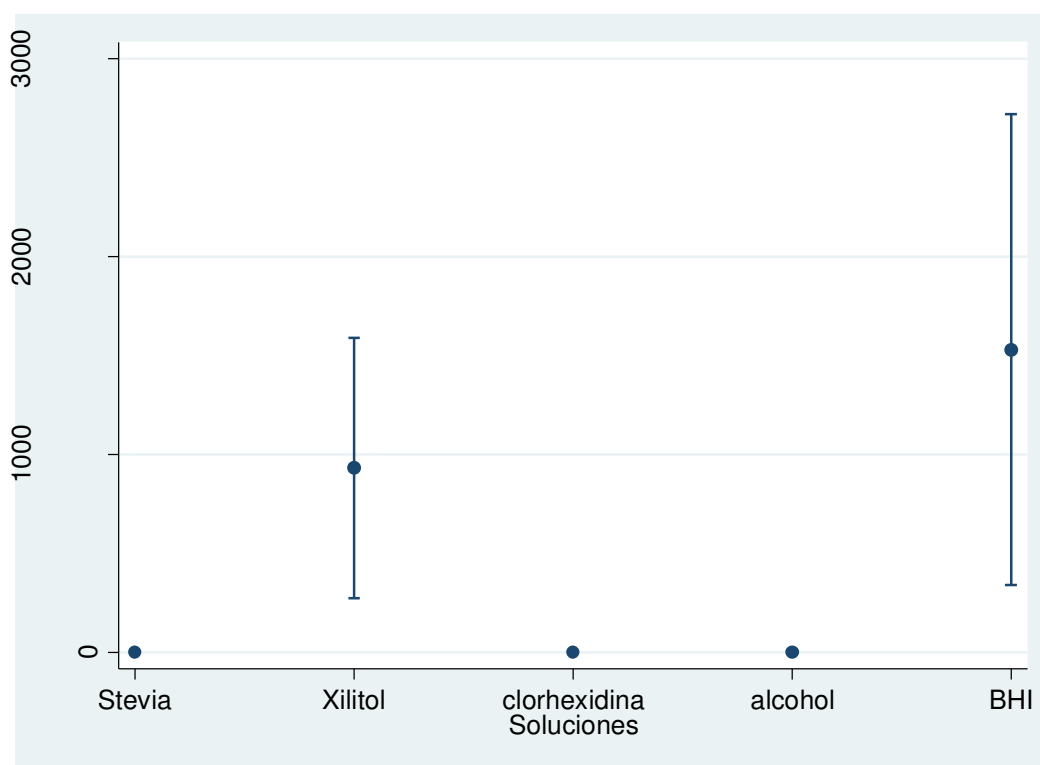
IQR: Rango intercuartílico

**Fuente:** Investigación

**Elaboración:** Bach. Maisely Galindo

En la **Gráfico 1.** se muestra que el caldo BHI infusión cerebro corazón presenta el índice más alto de crecimiento de flora mixta salival con  $1854 \times 10^{-4} \pm 1189,57$  UFC/ml. Mientras que la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol presento un índice de crecimiento bacteriano de  $816 \times 10^{-4} \pm 657,91$  UFC/ml, con una diferencia altamente significativa con respecto al extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, clorhexidina al 0,12% y etanol a 70°.

**Gráfico 1.** Diagrama de barras de error del número de Unidades Formadoras de colonias por ml (UFC/ml) del extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol, Clorhexidina al 0,12%, etanol a 70° y caldo BHI infusión cerebro corazón sobre Flora mixta salival a las 24 horas.



**Fuente:** Investigación

**Elaboración:** Bach. Maisely Galindo

Se realizó la prueba de normalidad (**Tabla N°5.**) para el recuento de unidades formados de colonias por ml (UFC/ml) de la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol, etanol a 70° y caldo BHI infusión cerebro corazón con la finalidad de demostrar que estos tienen una distribución normal ( $\alpha = 0.05$ ) al 95% de nivel de confianza. Se encontró que la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol y caldo BHI infusión cerebro corazón presentan distribución normal ( $p > 0,05$ ), mientras que el etanol a 70° no presenta distribución normal ( $p < 0,05$ ).

**Tabla N°5.** Prueba de normalidad de Shapiro – Wilk para las unidades formadoras de colonias por ml de solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol, etanol a 70° y caldo BHI infusión cerebro corazón sobre Flora mixta salival a las 24 horas.

<b>Soluciones</b>	<b>n</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>z</b>	<b>prob &gt; z</b>
Xilitol	6	0,96669	0,412	-1,124	0,86954
Etanol	3	0,75	3,723		-0,00005
Caldo BHI	3	0,94436	0,831	-0,114	0,54523

**Fuente:** Investigación

**Elaboración:** Bach. Maisely Galindo

Dado que una las soluciones (Etanol a 70°) no presenta distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskall Wallis para comparación de más de dos medianas.

En la **Tabla N°6.** utilizando la prueba de Kruskall Wallis se observa que existe diferencia significativa entre por lo menos una mediana de las 5 soluciones estudiadas ( $p < 0,05$ ). Para evaluar entre que grupos existen diferencias significativas utilizando el Test de Dunn, prueba post hoc de la prueba de Kruskall Wallis.



**Tabla N°6.** Kruskal Wallis para comparar las medianas de las Unidades Formadoras de colonias por ml (UFC/ml) del extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol, Clorhexidina al 0,12%, etanol a 70° y caldo BHI infusión cerebro corazón sobre Flora mixta salival a las 24 horas.

Soluciones	n	Suma - Rangos	X <sup>2</sup>	p
Stevia	6	36,00		
Xilitol	6	99,00		
Clorhexidina	3	18,00	17,591	0,0015
Etanol	3	24,00		
BHI	3	54,00		

**Fuente:** Investigación

**Elaboración:** Bach. Maisely Galindo

El resultado del Test de Dunn arrojó un valor Z, el cuál muestra que existe diferencias significativas entre el extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70° vs solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol y vs caldo BHI infusión cerebro corazón ( $p < 0,05$ ). En la comparación entre los grupos de las otras soluciones no hubo diferencia significativa ( $p > 0,05$ ). El resultado fue estimado con un rango de error de 0.05 (**Tabla N°7.**).

**Tabla N°7.** Prueba post hoc “Test de Dunn” para evaluar entre que grupos existen diferencias significativas para el extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol, Clorhexidina al 0,12%, etanol a 70° y caldo BHI infusión cerebro corazón sobre Flora mixta salival a las 24 horas.

<b>Soluciones</b>	<b>n</b>	<b>Z</b>	<b>p</b>	
Stevia vs Xilitol	12	-3.166	0.007	<0.05
Stevia vs clorhexidina	9	0.000	1.000	>0.05
Stevia vs etanol	9	-0.492	1.000	>0.05
Stevia vs BHI	9	-2.954	0.015	<0.05
Xilitol vs clorhexidina	9	2.584	0.049	<0.05
Xilitol vs etanol	9	2.093	0.181	>0.05
Xilitol vs BHI	9	-0.369	1.000	>0.05
Clorhexidina vs etanol	6	-0.426	1.000	>0.05
Clorhexidina vs BHI	6	-2.558	0.053	>0.05
Etanol vs BHI	6	-2.132	0.165	>0.05

**Fuente:** Investigación

**Elaboración:** Bach. Maisely Galindo

## VI. DISCUSIÓN

En la odontología la fitoterapia, es decir, el uso medicinal y preventivo de las plantas tiene cada día mayor vigencia, pero aún sigue tratándose de un campo nuevo en el que se necesita seguir investigando. La *S. rebaudiana* es una planta utilizada de manera tradicional por las múltiples propiedades que posee y al igual que el Xilitol un polialcohol, no son degradados por los microorganismos presentes en la flora bacteriana salival con el objetivo de producir caries dental y enfermedad periodontal.

En la presente investigación se buscó determinar y evaluar la actividad inhibitoria del extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70° y la solución acuosa a 1mg/ml de xilitol sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro*.

Según **Giertsen et al.**<sup>(15)</sup>, en su estudio probaron que las exposiciones repetidas a Xilitol al 7.5% a biopelículas orales mixtas *in vitro* de 6 especies (*Actinomyces naeslundii*, *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus oralis*, *Veillonella dispar* y *Streptococcus mutans* (8 cepas)), no inhibieron el crecimiento de las bacterias estudiadas, pero si disminuyeron los recuentos de colonias de *S. sobrinus* ( $7,8 \pm 0,6$  UFCs) y de *S. mutans* ( $9,8 \pm 1,9$  UFCs) en comparación al sorbitol que obtuvo mayores recuentos de colonias de *S. sobrinus* ( $9,7 \pm 0,5$  UFCs) y de *S. mutans* ( $14,0 \pm 3,2$  UFCs), a su vez también **Marttinen et al.**<sup>(17)</sup> compararon los efectos del xilitol sobre cepas de *S. mutans*, *A. naeslundii* y *S. sanguinis* sensibles y resistentes. En sus resultados demostró que la presencia de Xilitol al 5% produjo una caída de aproximadamente 1-log en los niveles de UFCs de las bacterias sensibles, pero los niveles de cepas resistentes no se modificaron. En el estudio de **Ghezelbash et al.**<sup>(18)</sup> se compararon los efectos del Xilitol al 2% y 4% y eritritol al 2% y 4% sobre el crecimiento de *Streptococcus* orales mediante la medida del diámetro de zonas de inhibición de crecimiento, dando como resultado que ambos inhibieron el crecimiento de *Streptococcus* pero el eritritol fue más eficaz con un 71% para *S. mutans*, 76% para *S.*

*sobrinus* y 77% para *S. sanguinis*. Así mismo, **Padilla et al.** <sup>(19)</sup> determinó el efecto antes y después de la aplicación de la pasta dental con xilitol al 36% sobre la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. mutans* en saliva y lo comparó con la pasta convencional con sólo flúor. Los resultados demostraron que luego de 5 semanas de uso de la pasta dental con Xilitol, los niveles de *S. mutans* en saliva disminuyeron, presentando entre 0 y 10 000 de UFC. **Salli et al.** <sup>(21)</sup> examinaron los recuentos bacterianos de *S. mutans* y *S. sobrinus* al ser expuestos a saliva artificial que contiene 1% de sacarosa, 2 - 5% de Xilitol y una combinación de ambas, los resultados demostraron que la presencia de xilitol al 2% disminuyó la cantidad de *S. mutans* y *S. sobrinus* en  $10^3$ , pero el aumento de la concentración de la misma no disminuyó de manera significativa el recuento bacteriano, mientras que la sacarosa al 1% promovió la proliferación de las misma hasta  $10^6$ . Finalmente **Eskandarian et al.** <sup>(14)</sup> determinaron los efectos bactericidas del tetrafluoride de titanio ( $\text{TiF}_4$ ), clorhexidina, fluoruro de sodio (NaF) y Xilitol sobre el *Streptococcus mutans*, los resultados demostraron que el xilitol no mostró tener efecto inhibidor o bactericida.

La investigación evaluó al igual que los estudios mencionados la actividad inhibitoria de la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol sobre los microorganismos presentes en la flora mixta salival, cuyo resultado fue que si disminuyó el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC/ml) pero no de manera estadísticamente significativa.

En el caso del extracto etanólico al 1,07 mg/ml de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, **Viteri et al.** <sup>(6)</sup> observaron el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de *Stevia rebaudiana* Bertoní en diferentes soluciones (agua, metanol, etanol, acetato de etilo y hexano) sobre el crecimiento *in vitro* del *S. mutans* y del *L. acidophilus*. Los resultados demostraron que los extractos con metanol, etanol y hexano como solventes mostraron igual o mejor capacidad inhibitoria del crecimiento al ser comparados con la vancomicina (16,5 mm). Así mismo, **Mohammadi-Sichani et al.** <sup>(16)</sup> evaluaron la actividad antibacteriana de las hojas de *S. rebaudiana* usando 4 solventes (metanol, etanol, acetona y agua) en concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,13 mg/ml, demostrando en los resultados que los extractos de

*Stevia rebaudiana* con metanol, etanol y acetona son muy efectivos para la inhibición del crecimiento de *S. mutans*, pero el extracto acuoso no lo es. **Pérez** <sup>(2)</sup> determinó que la acción inhibitoria del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* en etanol de 70° y etanol de 30° sobre *Streptococcus mutans* se presentó solo en la concentración de 1,07 mg/ml en etanol de 70°. También **Lingaraj et al.** <sup>(20)</sup> compararon la eficacia inhibitoria del extracto acuoso al 50% y etanólico de 70° de *Stevia rebaudiana* contra *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*, al compararlo con la clorhexidina. Los resultados demostraron que al final de las 48 horas, la clorhexidina mostró mayor diámetro de halos de inhibición para *S. mutans* pero no de manera significativa con respecto al extracto de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°. **Brambilla et al.** <sup>(12)</sup> evaluaron el efecto del esteviósido y rebaudiósido A mediante la elaboración de extractos de *S. rebaudiana* sobre *S. mutans*. Los resultados muestran que hubo crecimiento del biofilm pero en comparación a la sacarosa al 1% se dio un menor crecimiento cuya diferencia fue significativa. **Massón-Palacios et al.** <sup>(23)</sup> compararon la eficacia inhibitoria del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* al 2%, la fórmula industrial a 5mg/ml y en fórmula comercial a 5mg/ml. Los resultados demostraron que en general los tres extractos de *Stevia* consiguieron un efecto inhibidor del crecimiento sobre *S. mutans* y *S. sanguis*. **Urbina** <sup>(25)</sup> determinó que hubo actividad inhibitoria in vitro de un enjuague bucal a base de extracto etanólico de hojas de *Stevia rebaudiana* sobre *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 a partir de la concentración 1,07 mg/ml en etanol a 70°. **Brañez** <sup>(26)</sup> evaluó la actividad antibacteriana del extracto de *Stevia rebaudiana* frente a bacterias iniciadoras de la biopelícula dental, los resultados demostraron que el extracto de *S. rebaudiana* no presentó actividad antibacteriana sobre *Streptococcus sanguinis* y poca actividad sobre *Actinomyces viscosus*. **Guevara** <sup>(27)</sup> demostró que el efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de *Stevia* sobre *streptococcus mutans* se da solo en la concentración del 100% con un halo de inhibición de 9,33 mm, quedando en la zona de resistencia.

En este estudio se evaluó al igual que los estudios mencionados la actividad inhibitoria del extracto etanólico al 1,07 mg/ml en etanol a 70° de *Stevia rebaudiana* sobre los

microorganismos presentes en la flora mixta salival, cuyo resultado fue que no hubo presencia de unidades formadoras de colonias (0 UFC/ml).

En dos estudios similares realizados por **Kishta-Derani et al.** <sup>(22)</sup> donde determinó el efecto antibacteriano de la *Stevia rebaudiana* al 0,5% y 5%, este fue comparado con el Xilitol al 5% como control positivo, los resultados demostraron que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos respecto al número de bacterias, pero en la *S. rebaudiana* hubo un mayor crecimiento de bacterias que en el grupo tratado con Xilitol. Y en el estudio de **Tovar-Huaynate et al.** <sup>(24)</sup> demostraron que la *Stevia rebaudiana* tiene alta actividad inhibitoria frente al *S. mutans* en comparación al Xilitol a los 48 horas, pero menor efecto de inhibición frente a la clorhexidina al 2%.

En la investigación al comparar la actividad inhibitoria del extracto etanólico al 1,07 mg/ml de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70° y la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol, se observó que hubo diferencia significativa entre el número de colonias presentes en cada una de ellas, siendo el extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* el que obtuvo mayor efecto sobre la inhibición del crecimiento de los microorganismos presentes en la flora mixta salival.

Es necesario destacar que los autores antes mencionados en su mayoría, desarrollaron sus investigaciones usando el método de difusión de discos en placa para medir halos de inhibición, mientras que en nuestro estudio se optó por otro método como lo es el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml), ya que los resultados de las medidas de los halos de inhibición no eran los esperados y no se podía evaluar de manera clara la actividad inhibitoria de los compuestos.

## VII. CONCLUSIONES

Del estudio se concluye:

- El extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70° posee actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro* a las 24 horas mediante con un recuento de unidades formadoras de colonias de 0 UFC/ml en promedio, al igual que la clorhexidina al 0,12% y el etanol a 70°.
- La solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol no presenta una diferencia estadísticamente significativa frente al Caldo BHI infusión cerebro corazón con un recuento de unidades formadoras de colonias de  $931,66 \pm 657,91$  UFC/ml en promedio.
- De los edulcorantes estudiados, la mayor actividad inhibitoria lo presentó el extracto etanólico al 1,07 mg/ml de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70° frente a la solución acuosa a 1mg/ml en agua destilada de Xilitol sobre los microorganismos presentes en flora mixta salival a las 24 horas.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad bacteriostática y antifúngica del extracto etanólico al 1,07mg/ml de *Stevia rebaudiana* en etanol de 70°.
- Evaluar la actividad bacteriostática y antifúngica de la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol.
- Realizar estudios de identificación bacteriana para conocer cuáles son las cepas de los microorganismos presentes en la flora mixta salival que no fueron inhibidos por la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol.
- Se recomienda la continuidad de esta investigación realizando evaluación *in vitro* sobre bacterias específicas de la microbiota bucal, así también como una posterior evaluación *in vivo*.
- En base a la literatura estudiada y a los resultados obtenidos de este estudio se recomienda el uso del extracto etanólico al 1,07% de *Stevia rebaudiana* en etanol a 70°, al ser de bajo costo y fácil acceso. Así mismo se sugiere realizar otros estudios para evaluar su actividad antibacteriana incorporándolo en productos como gomas de mascar, enjuagues y pastas dentales que promuevan la higiene oral, en vista de la necesidad constante de nuevos y efectivos agentes.



## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Salud bucodental [Internet]. Ginebra, Suiza. 2012 [citado 24 de junio del 2018]. p. 1. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>
2. Pérez SP. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Universidad Nacional de Trujillo; 2013.
3. Bosquez RP. La prevención de la caries dental a través del uso de xilitol. Universidad de Guayaquil; 2013.
4. Park E, Na HS, Kim SM, Wallet S, Cha S, Chung J. Xylitol, an Anticaries Agent, Exhibits Potent Inhibition of Inflammatory Responses in Human THP-1-Derived Macrophages Infected With *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontol [Internet]. 2014;85(6):212–23. Disponible en: <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2014.130455>
5. Nayak PA, Nayak UA, Khandelwal V. The effect of xylitol on dental caries and oral flora. Clin Cosmet Investig Dent. 2014;6:89–94.
6. Vitery GR, Escribano S, Gamboa FO, Chavarría N, Gómez RÁ. Actividad inhibitoria de la *Stevia rebaudiana* sobre el *Lactobacillus acidophilus* y el *Streptococcus mutans*. Rev Nac Odontol. 2010;6(10):57–64.
7. Gamboa F, Chaves M. Antimicrobial potential of extracts from *Stevia rebaudiana* leaves against bacteria of importance in dental caries. Acta Odontol Latinoam. 2012;25(2):171–5.
8. Zhang Q, Yang H, Li Y, Liu H, Jia X. Toxicological evaluation of ethanolic extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: Genotoxicity and subchronic oral toxicity. Regul Toxicol Pharmacol. 2017;86:253–9.
9. Pereira JC, Esteves TJ, Costa LC, Ramos CA, Ribeiro MC, Pagani M, et al. Recubrimiento Pulpar Directo e Indirecto: Mantenimiento De La Vitalidad Pulpar.

Acta Odontol Venez. 2010;49(1):1–8.

10. Lee SH, Choi BK, Kim YJ. The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. *Arch Oral Biol*. 2012;57:697–703.
11. Giacaman RA. An in vitro and in vivo comparison of the effect of *Stevia rebaudiana* extracts [Internet]. 2013 [citado 12 de abril del 2015]. Disponible en: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/detail/detail?vid=36&sid=31debf7f-3670-45f0-ac05291ce1ee066b%40sessionmgr4003&hid=4106&bdata=Jmxhbm9ZXMmc2l0ZT1laG9zdC1saXZl#db=mnh&AN=24216624>.
12. Brambilla E, Cagetti MG, Ionescu A, Campus G, Lingström P. An in vitro and in vivo comparison of the effect of *stevia rebaudiana* extracts on different caries-related variables: A randomized controlled trial pilot study. *Caries Res*. 2014;48(1):19–23.
13. Pereira FF, Silva TC, Silva TL da, Caldana ML, Bastos JRM, Buzalaf MAR. Xylitol concentrations in artificial saliva after application of different xylitol dental varnishes. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2012;20(2):146–50. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666828>
14. Eskandarian T, Motamedifar M, Arasteh P, Eghbali SS, Adib A, Abdoli Z. Comparison of antimicrobial effects of titanium tetrafluoride, chlorhexidine, xylitol and sodium fluoride on *streptococcus mutans*: An in-vitro study. *Electron physician* [Internet]. 2017;9(03):4042–7. Disponible en: <http://www.ephysician.ir/index.php/browse-issues/2017/3/633-4042>
15. Giertsen E, Arthur RA, Guggenheim B. Effects of xylitol on survival of *mutans streptococci* in mixed-six-species in vitro biofilms modelling supragingival plaque. *Caries Res*. 2011;45(1):31–9.
16. Mohammadi-Sichani M, Karbasizadeth V, Aghai F, Reza M. Effect of different extracts of *Stevia rebaudiana* leaves on *Streptococcus mutans* growth. *J Med Plants*

- Res [Internet]. 2012;6(32):4731–4. Disponible en: [http://www.academicjournals.org/jmpr/abstracts/abstracts/abstracts2012/22Aug/Mohammadi-Sichani et al.htm](http://www.academicjournals.org/jmpr/abstracts/abstracts/abstracts2012/22Aug/Mohammadi-Sichani%20et%20al.htm)
17. Marttinen AM, Ruas-Madiedo P, Hidalgo-Cantabrana C, Saari MA, Ihalin RA, Söderling EM. Effects of xylitol on xylitol-sensitive versus xylitol-resistant streptococcus mutans strains in a three-species in vitro biofilm. *Curr Microbiol.* 2012;65(3):237–43.
  18. Ghezelbash GR, Khorasgani MR. Comparative inhibitory effect of xylitol and erythritol on the growth and biofilm formation of oral Streptococci Comparative inhibitory effect of xylitol and erythritol on the growth and biofilm formation of oral Streptococci. *African J Microbiol Res.* 2012;6(20):4404–8.
  19. Padilla TC, Castillo JL, Catacora PO. Efecto de la pasta dental con xilitol en el recuento de Streptococcus mutans en niños de 7 a 9 años. Estudio piloto. *Rev Investig Altoandina.* 2013;15(1):75–86.
  20. Lingaraj S, Shamarao S, Hemant B, Tirake S, Abdullah A, Sayed AM. Effect of aqueous and alcoholic Stevia (Stevia rebaudiana) extracts against Streptococcus mutans and Lactobacillus acidophilus in comparison to chlorhexidine: An in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent [Internet].* 2014;4(5):116–21. Disponible en: <http://www.jispcd.org/text.asp?2014/4/5/116/146215>
  21. Salli KM, Forssten SJ, Lahtinen AC. Influence of sucrose and xylitol on an early Streptococcus mutans biofilm in a dental simulator. *Arch Oral Biol.* 2016;70:39–46.
  22. Kishta-Derani M, Neiva G, Boynton J, Kim Y, Fontana M. The antimicrobial potential of stevia in an in vitro microbial caries model. *Am J Dent.* 2016;29(2):87–92.
  23. Massón-Palacios M, Armas-Vega A. Comparación de la efectividad antibacteriana de la Stevia rebaudiana sobre Streptococcus mutans y Streptococcus sanguinis. *KIRU.*

2016;13(2):127–32.

24. Tovar-Huaynate G, Cupé-Araujo A. Comparación con el xilitol , frente a los streptococcus mutans – un estudio in vitro. Rev OACTIVA UC Cuenca. 2016;1(2):51–4.
25. Urbina LM. Efecto antibacteriano in vitro de un enjuague bucal a diferentes concentraciones a base de extracto etanólico de Stevia rebaudiana sobre el crecimiento de Lactobacillus acidophilus ATCC 4356. Universidad Nacional de Trujillo; 2016.
26. Brañez K. Evaluación del efecto antibacteriano in vitro del extracto de Stevia rebaudiana sobre el Actinomyces viscosus y Streptococcus sanguinis , bacterias iniciadoras en la formación de biofilm dental. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
27. Guevara EL. Análisis del efecto inhibitorio de Stevia en diferentes concentraciones sobre Streptococcus mutans, estudio in vitro. Universidad Central del Ecuador; 2017.
28. Calorie Control Council. Xylitol - Polioles [Internet]. Calorie Control Council. 2018 [citado 03 de setiembre del 2018]. p. 1. Disponible en: <https://datosobrelospolios.com/xylitol/>
29. CRACX (Sweet for health spirit). Xilitol [Internet]. Vol. 6, EFSA Journal. 2008 [citado 03 de setiembre del 2018]. p. 852. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2008.852>
30. Guzmán A. ¿Qué es el Xilitol? [Internet]. Clínica dental Málaga Avilés y Román. 2013 [citado 03 de setiembre del 2018]. p. 1. Disponible en: <http://www.clinicadentalavilesyroman.com/que-es-el-xilitol/>
31. Ramírez K, Rojas O, Alvarado P, Vega-Baudrit J. Obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña ( ananascomusus ) xylose from lignocellulosic waste in the production and industrial

- processing. *Uniciencia*. 2012;26:75–89.
32. Tamanini C, Haully CM. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semin Ciências Agrárias*. 2004;25(4):315–30.
  33. Sciencelab.com Inc. Material Safety Data Sheet -D-Xylitol MSDS. Texas; 2010.
  34. Lima LHA, Berlinck CN. Xilitol, o adocante do futuro. *Cienc Hoje*. 2003;33:66–9.
  35. Gonzáles-Hernández JC, Alvarez-Navarrete M, Ornelas LC, Zamudio MA. Producción y aplicaciones Biotecnológicas del Xilitol. *BioTecnología-Tecnología*. 2011;15(2):22–47.
  36. Vallejos ME, Area MC, Chade M, Medvedeff MG, Felissia FE. Producción biotecnológica de xilitol utilizando *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*. *Unam*. 2013;1(April):1–5.
  37. Rao RS, Prakasham RS, Prasad KK, Rajesham S, Sarma PN, Rao L V. Xylitol production by *Candida* sp.: parameter optimization using Taguchi approach. *Process Biochem*. 2004;39(8):951–6.
  38. Feldman D, Wegener G. Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions. *J Polym Sci*. 1985;23(11):601–2.
  39. Carvalho W, Silva S, Santos J, Converti A. Xylitol production by ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems. *Enzyme Microb Technol*. 2003;32:553–9.
  40. Panesso EA, Calle MC, Meneses EJ. Salud bucal y xilitol: usos y posibilidades en caries y enfermedad periodontal en poblaciones “PEPE”. *Rev Univ salud*. 2012;14(2):205–15.
  41. Bravo G, Aguirre N, Bahamonde H. Xilitol y prevención de otitis media aguda. *Rev Otorrinolaringol y Cirugía Cabeza y Cuello*. 2012;72:97–102.
  42. Mickenautsch S, Yengopal V. Effect of xylitol versus sorbitol: A quantitative systematic review of clinical trials. *Int Dent J*. 2012;62(4):175–88.

43. Hirsch GB, Edelstein BL, Frosh M, Anselmo T. A Simulation Model for Designing Effective Interventions in Early Childhood Caries. *Prev Chronic Dis.* 2012;9(1):1–9.
44. Anderson M. Chlorhexidine and xylitol gum in caries prevention. *Spec care Dent.* 2003;173–6.
45. Söderling E. Controversies around Xylitol. *Eur J Dent* [Internet]. 2009;3(2):81–2. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2676064&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
46. Vongsavan K, Surarit R, Rirattanapong P. The combined effect of xylitol and fluoride in varnish on bovine teeth surface microhardness. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal.* 2014;45(2):505–10.
47. Ghiraldini B, Furushima ET, Casarin RCV, Villalpando KT, Pimentel SP, Cirano FR. Effect of cetylpyridinium chloride with xylitol on the formation of biofilm and development of gingivitis. *Braz J Oral Sci.* 2012;11(3):1–4.
48. Cobos C, Valenzuela E, Araiza MÁ. Influencia de un enjuague a base de fluoruro y xilitol en la remineralización in vitro del esmalte en dientes temporales. *Rev Odont Mex.* 2013;17(4):204–9.
49. Murthykumar K. The Impact of Milk with Xylitol on Dental Caries-A Review. *J Pharm Sci Res* [Internet]. 2013 [citado 12 de abril del 2015];5(9):178–80. Disponible en: <http://search.proquest.com/docview/1506149956/fulltextPDF/64AF909FCCE2419BPQ/12?accountid=12268>
50. Alves FRF, Neves MAS, Silva MG, Rôças IN, Siqueira JF. Antibiofilm and antibacterial activities of farnesol and xylitol as potential endodontic irrigants. *Braz Dent J.* 2013;24(3):224–9.
51. Leepel L, Sastra S, Puspitawati R, Bachtiar B. Effect of xylitol with various

- concentration and duration on the growth of candida albicans ( in vitro study ).  
Indones J Dent. 2009;16(1):72–6.
52. Mäkinen KK. Sugar Alcohol Sweeteners as Alternatives to Sugar with Special Consideration of Xylitol. Med Princ Pr. 2011;20:303–20.
  53. CDA. Xylitol - El endulzador que ayuda a prevenir las caries. Sacramento; 2014.
  54. Riley P, Moore D, Ahmed F, Sharif M, Worthington H. Xylitol and caries prevention. Evid Based Dent. 2015;16(2):37–8.
  55. Campus G, Cagetti MG, Sale S, Petruzzi M, Solinas G, Strohmenger L, et al. Six months of high-dose xylitol in high-risk caries subjects--a 2-year randomised, clinical trial. Clin Oral Invest [Internet]. 2013 [citado 11 de abril del 2015];17:785–91. Disponible en: <http://search.proquest.com/docview/1319510249/fulltextPDF/4A06059DD05B4B66PQ/1?accountid=12268>
  56. Mendiola MÁ, Martínez JB. Estevia, el edulcorante natural. In: IV Congreso de Estudiantes Universitario de Ciencia, Tecnología e Ingeniería Agronómica. Madrid; 2011. p. 173–5.
  57. Vera CD. Efecto de la fertilización nitrogenada en el cultivo de Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) en la producción de materia seca. Bajo condiciones de San Martín. Universidad Nacional de San Martín; 2016.
  58. Daciw MG. Stevia rebaudiana bertoni, Kaá-heé. UNQ. 2005;1:52–64.
  59. Martínez M. Revisión bibliográfica Stevia rebaudiana ( Bert .) Bertoni . Una revisión. Cultiv Trop. 2015;36:5–15.
  60. Moreno AE. Análisis de la incidencia y relación de los factores ambientales en el desarrollo vegetativo de la Stevia rebaudiana B. en condiciones de invernadero en la sabana de Bogotá. Universidad de la Sabana; 2012.
  61. Vargas E. Evaluación de la actividad antioxidante, cuantificación de polifenoles

- totales y catequina en hojas de Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni). Universidad Nacional Agraria de la Selva; 2011.
62. Contreras MS. Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of Stevia rebaudiana Bertoni. Narrative review. Journal of Oral Research. 2013.
  63. Suárez I, Salgado J. Propagación In Vitro de Stevia rebaudiana Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis. Temas Agrar. 2008;13(1):40–8.
  64. Alvarenga S, Salazar T. Micropropagación masiva de Stevia rebaudiana Bertoni en sistemas de inmersión temporal. Cultiv Trop. 2015;36(3):50–7.
  65. Durán S, Rodríguez M del P, Córdón K, Record J. Estevia (Stevia rebaudiana), edulcorante natural y no calórico. Rev Chil Nutr. 2012;39(4):203–6.
  66. Salvador-Reyes R, Sotelo-Herrera M, Paucar-Menacho L. Estudio de la Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. Sci Agropecu. 2014;5:157–63.
  67. Ramírez G, Avilés W, Moguel Y, Sergio G, May C. Estevia (Stevia rebaudiana, Bertoni), un cultivo con potencial productivo en México. Sagarpa; 2011.
  68. Woelwer-Rieck U, Lankes C, Wawrzun A, Wüst M. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of Stevia rebaudiana. Eur Food Res Technol. 2010;231:581–8.
  69. Rajasekaran T, Ramakrishna A, Udaya K, Giridhar P, Ravishankar G. Analysis of Predominant Steviosides in Stevia rebaudiana Bertoni by Liquid Chromatography / Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. Food Biotechnol. 2005;19(2):37–41.
  70. Melis MS. Effects of chronic administration of Stevia rebaudiana on fertility in rats. J Ethnopharmacol. 1999;67:157–61.
  71. Takahashi K, Matsuda M, Ohashi K, Taniguchi K, Nakagomi O, Abe Y, et al. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from Stevia rebaudiana. Antiviral Res. 2001;49:15–24.



72. Zhang Q, Yang H, Li Y, Liu H, Jia X. Toxicological evaluation of ethanolic extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: Genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2017;86:253–9.
73. Pezzuto J, Compadre C, Swanson S, Nanayakkara D, Kinghorn AD. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82(1):2478–82.
74. Serkonten. Bactericida y Bacterostático. Diferencias y usos generales de ellos [Internet]. phs. 2018 [citado 25 de setiembre del 2018]. p. 1. Disponible en: <https://www.phsserkonten.com/higiene/bactericida-bacteriostatico/>
75. Diccionario enciclopédico Larousse. Bacteriostática - significado de bacteriostática diccionario [Internet]. The free dictionary by farlex. 2018 [citado 25 de setiembre del 2018]. p. 1. Disponible en: <https://es.thefreedictionary.com/bacteriostática>
76. Llena C. La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías. Scielo- Medicina Oral, Patología Oral y cirugía Bucal. 2006.
77. Hernández AA, Aranzazu GC. Características Y Propiedades Físico-Químicas De La Saliva : Una Revisión. *Rev UstaSalud.* 2012;11:102–12.
78. Chamilco AS. Variación del PH y flujo salival durante el periodo gestacional en embarazadas de un servicio asistencial público [Salud pública dental]. [Lima - Perú]: UNMSM; 2013.
79. Almerich JM. Simposio sobre: Saliva y Salud Dental. Valencia; 1998.
80. Negroni M. Ecología Bucal. In: Alviar T. M, editor. Microbiología Estomatológica. 2da ed. Buenos Aires; 2009. p. 55.
81. Takahashi N. Oral microbiome metabolism: From “who are they?” to “what are they doing?” *J Dent Res.* 2015;94(12):1628–37.
82. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DTW. Salivary

- biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):781–91.
83. Cruz SM, Díaz P, Arias D, Mazón GM. Microbiota of oral cavity ecosystems. *Rev Cuba Estomatol.* 2017;54(1):84–99.
  84. Mestres L. Aceite esencial y extracto alcohólico ¿tienen las mismas propiedades? [Internet]. AromaTraining. 2018 [citado 25 de setiembre del 2018]. p. 1. Disponible en: <https://aromatraining.com/aceite-esencial-y-extracto-alcoholico-tienen-las-mismas-propiedades/>
  85. FQS Farmaquímica Sur. Extractos secos, fluidos y glicólicos [Internet]. FQS. 2018 [citado 25 de setiembre del 2018]. p. 1. Disponible en: <http://www.farmaquimicasur.com/extractos-secos-fluidos-glicolicos/>
  86. González A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas. Universidad Nacional de Colombia; 2004.
  87. Diccionario médico. ¿Qué es solución acuosa? [Internet]. Clínica Universidad de Navarra. 2018 [citado 25 de setiembre del 2018]. p. 1. Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/solucion-acuosa>
  88. Estebané V. Capítulo 6 : La química de las soluciones acuosas Introducción. México D.F.; 2018. Report No.: 6.
  89. Camacho A, Giles M, Ortegón A, Palao M, Serrano B, Velázquez O. Cuenta en placa de bacterias. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. México; 2009. Report No.: 2° ed.
  90. Sánchez E, Núñez D, Cruz R, Torres M, Herrera E. Simulación y conteo de unidades formadoras de colonias. *ReCIBE.* 2017;6(1):1–9.
  91. Lopez L, Torres C. Estudio Cuantitativo de Bacterias [Internet]. Microbiología general. Argentina; 2006. Report No.: 5. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp5.pdf>

92. Izurieta N. Recuento bacteriano [Internet]. 2011 [citado 25 de setiembre del 2018]. Report No.: 4. Disponible en: <https://es.slideshare.net/nataliaizurieta/laboratorio-no-4-recuento-bacteriano-7723447>
93. Beltran H. CONSTANCIA N°039-USM-2017. Vol. 39, Herbario San Marcos. Lima - Perú; 2017.
94. HYLEN CO. L. HYLEN [Internet]. Vitafood europe. 2016. p. 1. Disponible en: [http://www.hylen.cn/products\\_detail/productId=59.html](http://www.hylen.cn/products_detail/productId=59.html)
95. Scientific 3B. Espátula de Drigalski [Internet]. 3BScientific. 2018 [citado 28 de setiembre del 2018]. p. 1. Disponible en: [https://www.3bscientific.com/espátula-de-drigalski-cabecal-recto,p\\_1264\\_18959.html](https://www.3bscientific.com/espátula-de-drigalski-cabecal-recto,p_1264_18959.html) ©
96. Química F. Medición del crecimiento microbiano [Internet]. México; 2010. Disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4b\\_MedicionCrecimiento\\_19837.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4b_MedicionCrecimiento_19837.pdf)
97. Delgadillo A, González V, Hernandez M. Morfología de las colonias bacterianas. Comun Breve [Internet]. 2002;1:5. Disponible en: <https://microdonto.files.wordpress.com/2009/03/morfologia-de-las-colonias-bacterianas.pdf>

X. ANEXOS

Anexo 1:

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA STEVIA REBAUDIANA

 UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL 

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

**CONSTANCIA N° 039-USM-2017**

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (hojas) recibida de **Maisely GALINDO GOMEZ** de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Stevia rebaudiana*** (Bertoni) y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: ASTERALES**

**FAMILIA: ASTERACEAE**

**GENERO: *Stevia***

**ESPECIE: *Stevia rebaudiana* (Bertoni)**

Nombre vulgar: "stevia"  
Determinado por Mag. Hamilton Beltran Santiago.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 31 de marzo de 2017

  
**Mag. ASUNCIÓN CANO ECHEVARRÍA**  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/ddb

Anexo 2:

ANÁLISIS QUÍMICO DEL XILITOL

**HYLEN**  
 HYLEN CO.,LTD.

---

**Certificate of Analysis**

**Product Name:** Xylitol Fine Powder

**Qty:** 400KGS

**Manufacture date:** Jun.03,2017

**Expiry date:** Jun.02,2019

**Invoice No.:** SM17XF159

**Batch No:** 117060313

**Date:** Jun.19,2017

**ORDER NO.:** AQ-761

Items	Reference Standard FCC/USP	Result
Identification	Meets the requirement	Confirms
Appearance	White crystalline powder	White crystalline powder
Assay(dry basis), %	98.5-101.0	99.73
Other polyols, %	≤1.0	0.27
Loss on drying, %	≤0.3	0.08
Residue on ignition, %	≤0.1	0.020
Reducing sugars, %	≤0.2	0.014
Heavy metals, %	≤0.0005	<0.0005
Arsenic, %	≤0.00005	<0.00005
Nickel, %	≤0.0001	0.000008
Lead, %	≤0.0001	0.000022
Sulfate, %	≤0.005	<0.002
Chloride, %	≤0.005	<0.001
Melting point, °C	92.0-96.0	93.4
pH in aqueous solution	5.0-7.0	6.08
Total plate count, cfu/g	≤100	<10
Coliform, MPN/g	≤3	<3
Salmonella	Not detected	No detected
Yeast&Mold, cfu/g	≤100	<10

Product is USP 39, FCC 9

Checker:

Inspector:

For and on behalf of  
**HYLEN CO., LTD.**  
  
 Authorized Signatory

## INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS y CONSENTIMIENTO INFORMADO:



**Año del buen servicio al ciudadano”**

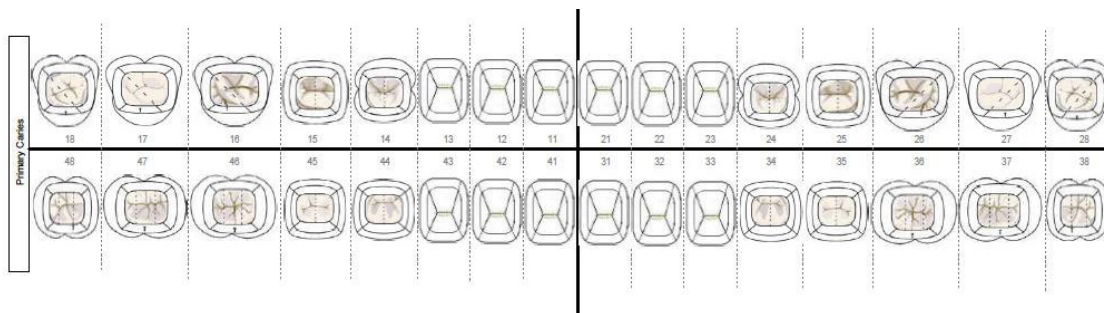
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**NOMBRE:** \_\_\_\_\_ **EDAD:** \_\_\_\_\_

**ENFERMEDAD SISTÉMICA:** SI ( ) NO ( )      **HALITOSIS:** SI ( ) NO ( )

**CANDIDIASIS:** SI ( ) NO ( ) **CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS:** SI ( ) NO ( )



**CARIES DENTAL:** SI ( ) NO ( )

### Consentimiento Informado para Participantes de Investigación

El propósito de esta ficha de consentimiento es proveer a los participantes en esta investigación con una clara explicación de la naturaleza de la misma, así como de su rol en ella como participantes.

La presente investigación es conducida por Maisely Fabiluz GALINDO GOMEZ, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La meta de este estudio es determinar la efectividad en actividad inhibitoria de dos edulcorantes, *Stevia rebaudiana* y xilitol, sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, *in vitro*.

Si usted accede a participar en este estudio, se le pedirá morder un pedazo de parafina sin sabor y vaciar la saliva que este proceso genere en un frasco estéril. Esto tomará aproximadamente 5 minutos de su tiempo. La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma.

Desde ya le agradecemos su participación.

Acepto participar voluntariamente en esta investigación.

-----Nombre del Participante

Participante Firma del Participante Fecha

(en letras de imprenta)

**Anexo 4:****INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Ficha de recolección de datos para el método de recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

		<b>Extracto etanólico al 1,07% de <i>Stevia rebaudiana</i> en etanol a 70°</b>		<b>Solución acuosa a 1mg/ml de xilitol</b>		<b>Clorhexidina al 0,12%</b>	<b>Etanol a 70°</b>	<b>Caldo BHI</b>
		1	2	1	2			
<b>UFC</b>	<b>Muestra 1</b>							
	<b>Muestra 2</b>							
	<b>Muestra 3</b>							
	<b>Muestra 4</b>							
	<b>Muestra 5</b>							
	<b>Muestra 6</b>							
	<b>Muestra 7</b>							

## Anexo 5:

### MATRIZ DE CONSISTENCIA

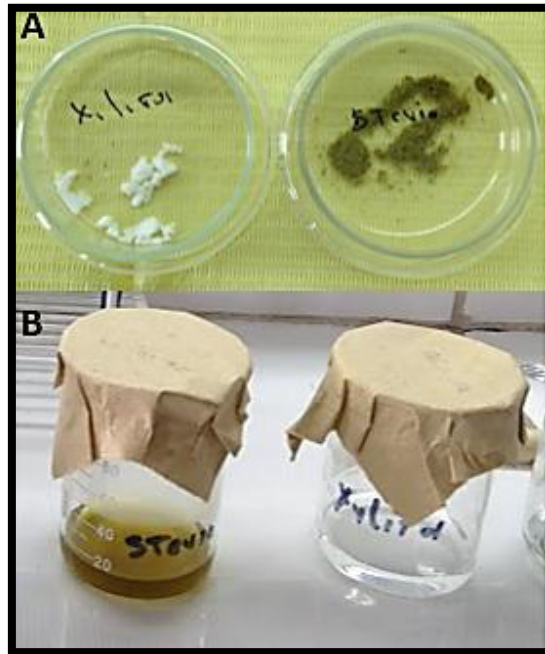
Título: “Actividad inhibitoria de la *Stevia rebaudiana* y Xilitol sobre flora mixta salival”

Problema	Objetivos	Hipótesis	Operacionalización de Variables				Metodología
			Variables	Dimensión	Indicador	Valores	
¿Presentarán actividad inhibitoria el extracto etanólico al 1,07mg/ml de <i>Stevia Rebaudiana</i> en etanol a 70° y la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, <i>in vitro</i> ?	<b>Objetivo general:</b> Determinar y evaluar la actividad inhibitoria del extracto etanólico al 1,07 mg/ml de <i>Stevia rebaudiana</i> en etanol a 70° y la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, <i>in vitro</i> <b>Objetivos específicos:</b> Determinar y analizar la actividad inhibitoria del extracto etanólico al 1,07 mg/ml en etanol a 70° de <i>Stevia rebaudiana</i> sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, <i>in vitro</i> a las 24 horas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias	<b>Hipótesis general:</b> El extracto etanólico al 1,07% de <i>Stevia rebaudiana</i> en etanol a 70° y la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol poseen actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, <i>in vitro</i> <b>Hipótesis específicas:</b> El extracto etanólico al 1,07 mg/ml en etanol a 70° de <i>Stevia rebaudiana</i> posee actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, <i>in vitro</i> a las 24 horas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).	Edulcorante natural	Stevia rebaudiana	Extracto etanólico	<i>Stevia rebaudiana</i> al 1,07 mg/ml en etanol a 70°	<b>Tipo de estudio:</b> Experimental Transversal Prospectivo In vitro  <b>Población y muestras:</b> La población bajo estudio está conformada por el conjunto de placas de Petri con Agar Tripticasa Soya TSA, que contendrán al extracto etanólico de la <i>Stevia rebaudiana</i> a una concentración de 1,07 mg/ml en etanol a 70° y con solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol.  <b>Muestreo:</b>
				Xilitol	Solución acuosa	Solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol	



	<p>(UFC).</p> <p>Determinar y analizar la actividad inhibitoria de la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, <i>in vitro</i> a las 24 horas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).</p> <p>Comparar la actividad inhibitoria del extracto etanólico al 1,07 mg/ml en etanol a 70° de <i>Stevia rebaudiana</i> y de la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol sobre los microorganismos presentes en flora mixta salival, <i>in vitro</i> a las 24 horas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).</p>	<p>La solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol posee actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en flora mixta salival, <i>in vitro</i> a las 24 horas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).</p> <p>. El extracto etanólico al 1,07 mg/ml en etanol a 70° de <i>Stevia rebaudiana</i> posee mayor actividad inhibitoria que la solución acuosa a 1mg/ml de Xilitol sobre los microorganismos presentes en flora mixta salival, <i>in vitro</i> a las 24 horas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).</p>	Actividad inhibitoria		Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml)	UFC/ml	<p>Porbablístico.</p> <p><b>Técnicas</b></p> <p>Se realizó la obtención del extracto de <i>Stevia rebaudiana</i> y la solución del xilitol, para su posterior siembra en Agar Tripticasa sota TSA con factor de dilución en <math>10^{-2}</math> para todas las soluciones estudiadas. Para conocer la actividad inhibitoria se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) en placa.</p>
			Tiempo de estimulación de flujo salival		Minutos expuestos a la parafina.	min	
			Bacterias orales		Cantidad de saliva recolectada	ml	

**Anexo 6:**  
**FIGURAS**



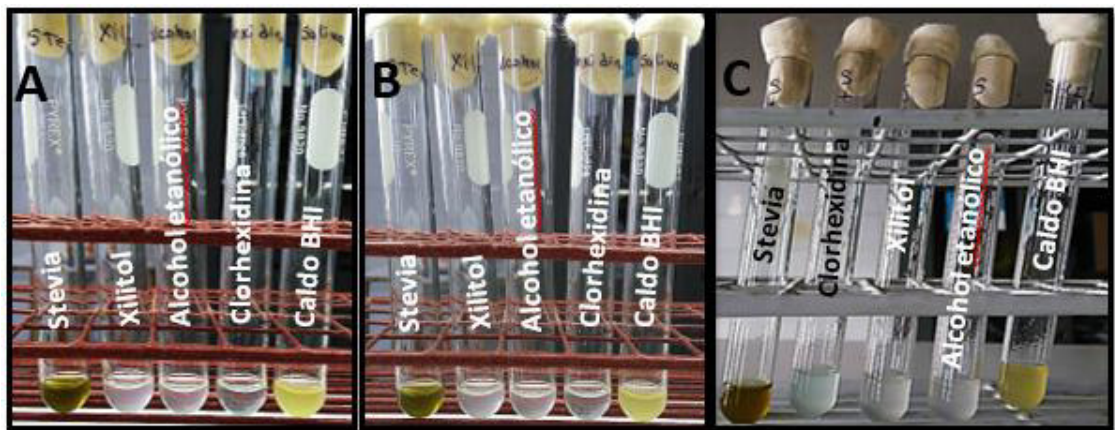
**Figura 5.** A) Xilitol en polvo (derecha) y extracto de *Stevia rebaudiana Bertoni* (izquierda), luego de ser pesadas en balanza calibrada. B) Disolución de *Stevia rebaudiana Bertoni* al 1,07 mg/ml en etanol de 70° (derecha) y disolución de Xilitol al 100% con agua destilada.



**Figura 6.** Materiales usados para la ejecución del proyecto en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de odontología de la UNMSM.

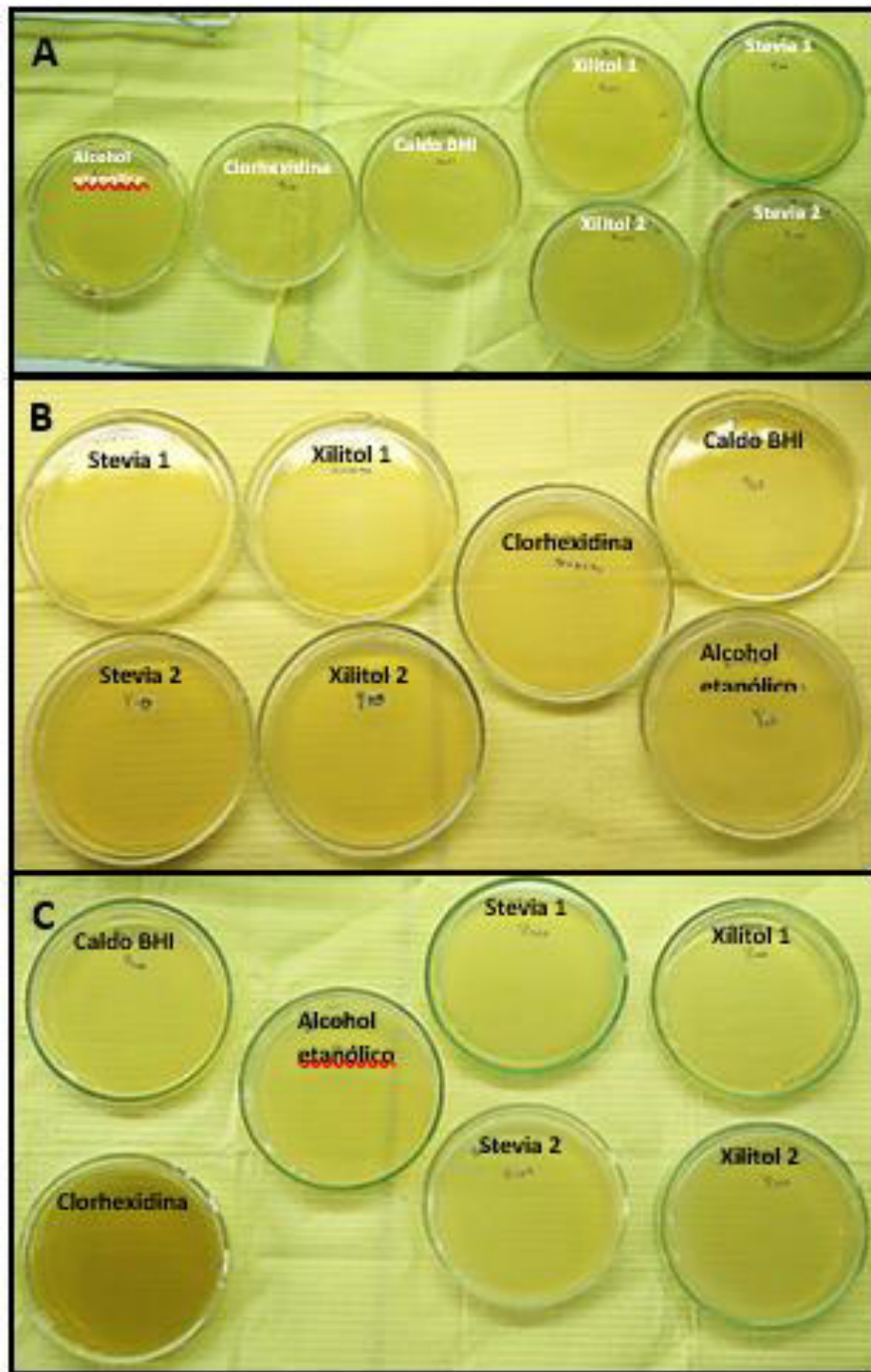


**Figura 7.** Disoluciones de Stevia rebaudiana Bertonii, Xilitol. Alcohol etanólico de 70°



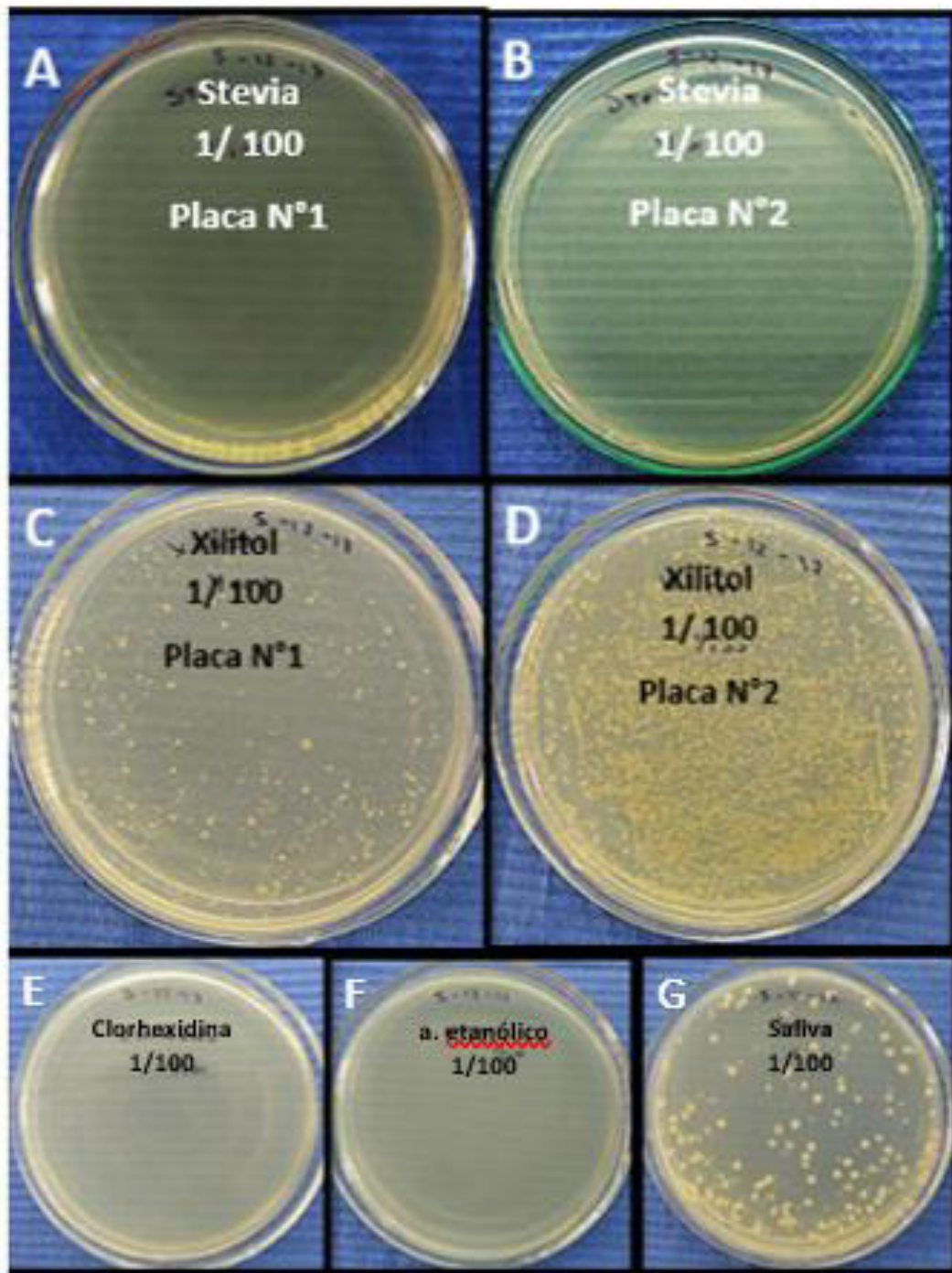
**Figura 8.** A) **Muestra 1:** Tubos de ensayo luego de 24 horas de incubación con diferentes grados de turbidez. B) **Muestra 2:** Tubos de ensayo luego de 24 horas de incubación con diferentes grados de turbidez. C) **Muestra 3:** Tubos de ensayo luego de 24 horas de incubación con diferentes grados de turbidez.

Y clorhexidina al 0,12%. Muestra de saliva.

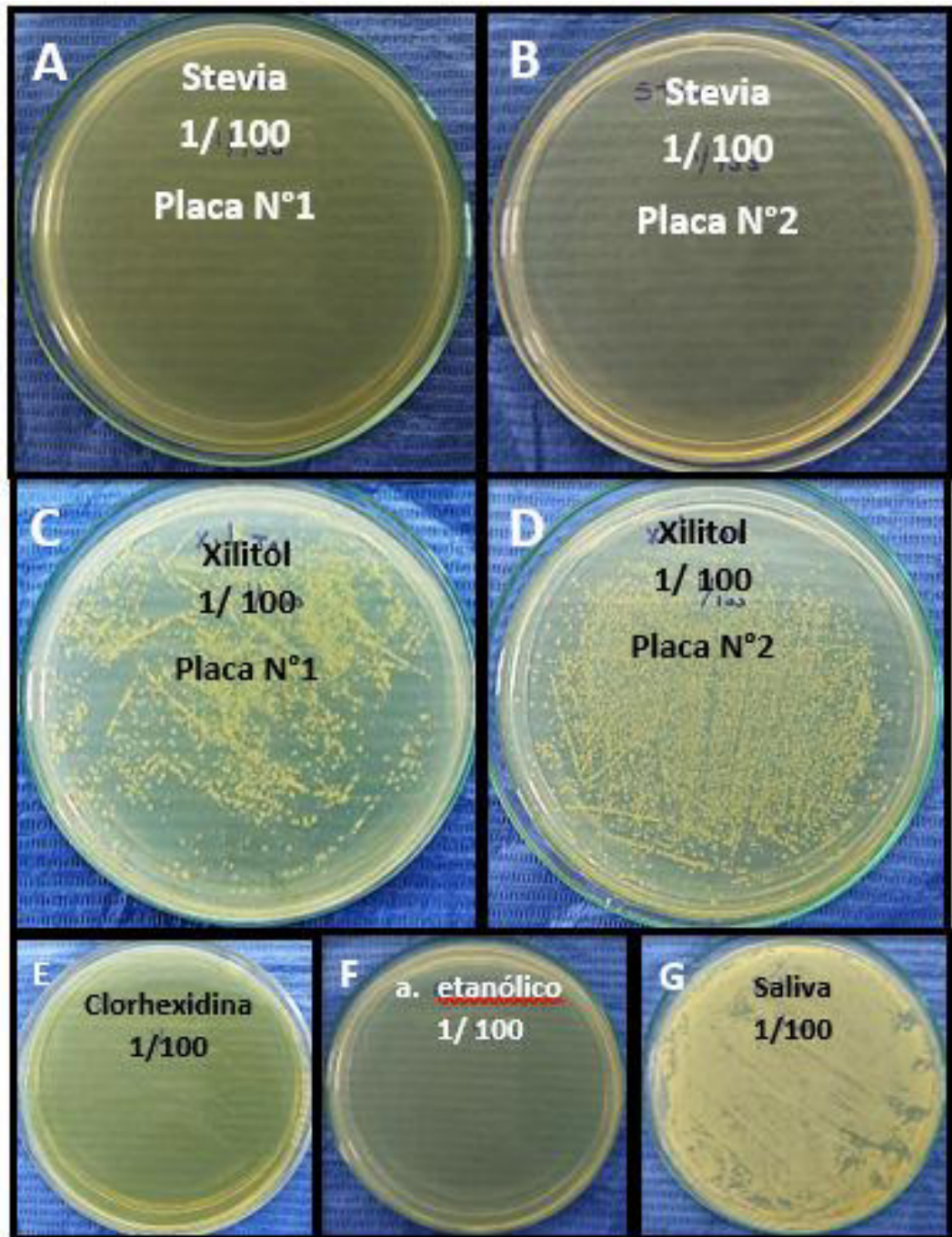


**Figura 9.** A) **Muestra 1:** Placas de Petri con Agar Tripticasa soya TSA sembradas. B) **Muestra 2:** Placas de Petri con Agar Tripticasa soya TSA sembradas. C) **Muestra 3:** Placas de Petri con Agar Tripticasa soya TSA sembradas



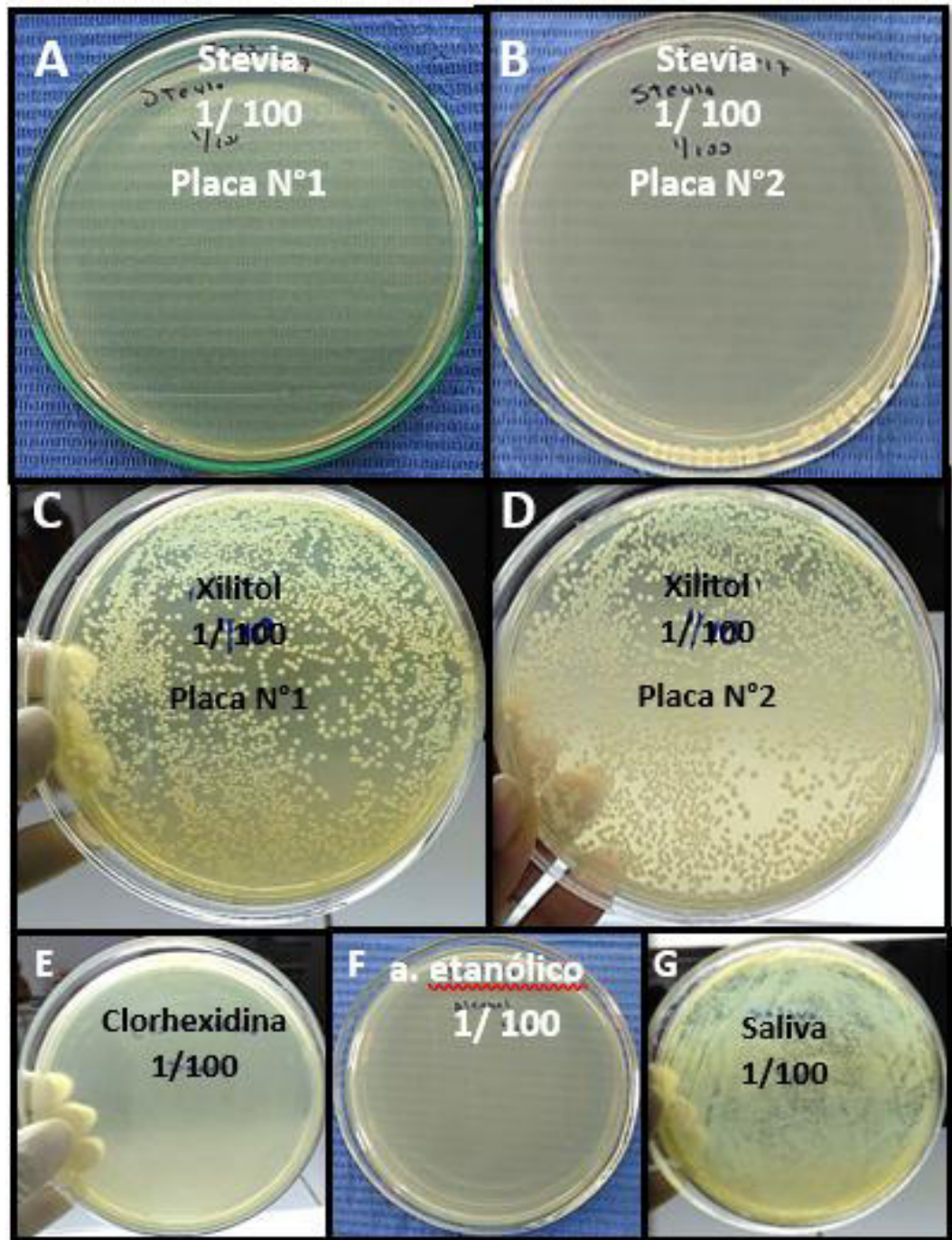


**Figura 10. Muestra 1** A) y B) No se observa crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) en extracto etanólico de 70° al 1,07% de Stevia rebaudiana. C) y D) Se observa crecimiento de UFC en solución acuosa al 1mg/ ml de Xilitol. E) No se observa crecimiento de UFC en clorhexidina al 0,12%. F) No se observa crecimiento de UFC en alcohol etanólico de 70°. G) Se observa crecimiento de UFC en caldo BHI infusión cerebro corazón.



**Figura 11. Muestra 2** A) y B) No se observa crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) en extracto etanólico de 70° al 1,07% de Stevia rebaudiana. C) y D) Se observa crecimiento de UFC en solución acuosa al 1mg/ ml de Xilitol. E) No se observa crecimiento de UFC en clorhexidina al 0,12%. F) Se observa el crecimiento de 1 UFC/ml en alcohol etanólico de 70°. G) Se observa crecimiento de UFC en caldo BHI infusión cerebro corazón. de 1 UFC/ml en alcohol etanólico de 70°. G) Se observa crecimiento de UFC en caldo BHI infusión cerebro corazón.





**Figura 12.** Muestra 3 A) y B) No se observa crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) en extracto etanólico de 70° al 1,07% de Stevia rebaudiana. C) y D) observa Se observa crecimiento de UFC en solución acuosa al 1mg/ ml de Xilitol. E) No se crecimiento de UFC en clorhexidina al 0,12%. F) No se observa crecimiento de UFC en alcohol etanólico de 70°. G) Se observa crecimiento de UFC en caldo BHI infusión cerebro corazón.